BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGÍA DE LA CONDUCTA Y EL CONTROL MOTOR

"Estudio del sistema orexinérgico en un modelo animal de narcolepsia: la rata *taiep*"

TESIS

Que para obtener el título de:

Licenciada en Biomedicina

PRESENTA:

Karely Guadalupe Espinoza Pérez

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ma. del Carmen Cortés Sánchez

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Ramón Eguibar Cuenca

Heroica Puebla de Zaragoza; Noviembre 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a la Facultad de Medicina y al Instituto de Fisiología por haberme permitido realizar mis estudios universitarios y poder concluir mi proyecto de tesis dentro de sus instalaciones.

A los proyectos CONACyT con números 243247 y 243333 a favor del Dr. José Ramón Eguibar Cuenca y la Dra. Ma. del Carmen Cortés, respectivamente.

Al apoyo recibido por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) y la Subsecretaría de Educación Superior – Secretaria de Educación Pública (SESSEP) para el cuerpo académico en Neuroendocrinología, BUAP-CA-288.

Al apoyo recibido como ayudante de investigador nivel III del Sistema Nacional de Investigadores.

Agradezco al Dr. José Ramón Eguibar y a la Dra. Carmen Cortés por haberme permitido realizar mi proyecto de tesis en el Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y el Control Motor. Agradezco a ambos el apoyo, la confianza y las enseñanzas brindadas durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Carolina Escobar Briones por su apoyo y asesoría metodológica para la realización del proyecto, su amplia experiencia y conocimientos me orientaron al correcto desarrollo y culminación exitosa de los experimientos del trabajo.

Al jurado de examen: la Dra. Amira del Rayo Flores y el Dr. Celso Enrique Cortés.

A mis amigos, Andrea, Miranda y Alfonso, por hacer más amena mi estancia en la carrera y en el laboratorio y por haber sido soporte y compañía durante el periodo de estudio.

Agradezco a los integrantes del Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y Control Motor: a la M.C. Aracely Ugarte por su apoyo en los procesos experimentales realizados en este trabajo, al M.V.Z. Omar Isidro por el cuidado y mantenimiento de los animales de laboratorio. A mis compañeros de laboratorio por el apoyo brindado: Adriela, Lilia, Juan, Ángeles Dorantes, Ángeles Carrasco, Sandra, Adriana, Amiel, Nagib, Juan Carlos, Salvador, Rubén, Estefanía y Ana.

DEDICTATORIA

A mi familia:

Quiero dedicar mi tesis a las personas que me motivan constantemente para alcanzar lo anhelado: mi papá Marco Antonio, mi tía Paty, mi abuelita Magdalena y a mi mamá, por ser motor e inspiración para concluir mi objetivo y por ser cimiento de mi formación tanto profesional como humana.

A mis hermanos, Marco Antonio Espinoza Pérez, por ser apoyo fundamental para lograr los objetivos propuestos y por sentar las bases de la responsabilidad y ser ejemplo de superación, y Carlos Eduardo Espinoza Pérez, por ser fuente motivadora para seguir adelante durante todo este proceso y por estar conmigo en todo momento.

A toda mi familia por su comprensión, impulso y apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida.

ÍNDICE

1. RESUMEN---------- 9

2. INTRODUCCIÓN ---------- 11

2.1 Ritmos biológicos ---------- 11

2.2 Ciclo sueño-vigilia ---------- 11

2.2.1 El estado de vigilia ---------- 13

2.2.2 El estado de sueño ---------- 16

2.2.2.1 El sueño de ondas lentas ---------- 16

2.2.2.2 El sueño con movimientos oculares rápidos (MOR) ---------- 18

2.3 El ciclo sueño-vigilia en la rata como modelo experimental ---------- 19

2.4 Regulación de la vigilia y el sueño ---------- 19

2.4.1 Principales neurotransmisores involucrados en la regulación del ciclo sueño-vigilia ---------- 22

2.4.1.1 Noradrenalina ---------- 22

2.4.1.2 Serotonina ---------- 22

2.4.1.3 Histamina ---------- 22

2.4.1.4 Acetilcolina ---------- 23

2.4.1.5 Ácido γ-aminobutírico (GABA) ---------- 23

2.5 Cambios fisiológicos durante el sueño ---------- 24

3. ANTECEDENTES GENERALES ---------- 24

3.1 Clasificación de los trastornos del sueño ---------- 24

3.2.1 Insomnio ---------- 26

3.2.2 Trastornos respiratorios relacionados con el sueño ---------- 26

3.2.3 Trastornos del ritmo circadiano ---------- 26
3.2.4 Las parasomnias ---------- 27
3.2.5 Los trastornos del movimiento durante el sueño ---------- 27
3.2.6 Los trastornos de hipersomnolencia de origen central ---------- 28
3.2.7 Trastorno prototípico de hipersomnolencia: narcolepsia ---------- 28
3.3 Las orexinas ---------- 33
3.3.1 Las neuronas productoras de orexinas ---------- 35
3.3.2 Las orexinas y la narcolepsia ---------- 39
4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS ---------- 40
4.1 Modelos experimentales en narcolepsia ---------- 40
4.1.1 Perros narcolépticos ---------- 41
4.1.2 Ratones carentes de uno o varios genes ---------- 42
4.1.3 Modelo de roedores transgénicos orexina/ataxina-3 ---------- 42
4.1.4 Modelo experimental en ratas ---------- 43
4.2 La rata *taiep* como un modelo de narcolepsia-cataplejía ---------- 43
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ---------- 47
6. HIPÓTESIS ---------- 47
7. OBJETIVOS ---------- 48
7.1 Objetivo general ---------- 48
7.2 Objetivos específicos ---------- 48
8. MATERIAL Y MÉTODOS ---------- 48
8.1 Animales de experimentación ---------- 48
8.2 Perfusión intracardiaca ---------- 49
8.3 Cortes histológicos cerebrales ---------- 49

8.4 Inmunohistoquímica ---------- 50
8.5 Montaje de los cortes cerebrales ---------- 51
8.6 Tren de deshidratación de cortes cerebrales ---------- 51
8.7 Elección de los cortes cerebrales ---------- 51
8.8 Adquisición y procesamiento de imágenes ---------- 52
8.8 Conteo neuronal y análisis histológico ---------- 52
8.9 Análisis estadístico ---------- 52
9. RESULTADOS ---------- 53
9.1 Comparación del número de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 3 meses de edad ---------- 53
9.2 Comparación del número de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 6 meses de edad ---------- 54
9.3 Comparación del número de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 9 meses de edad ---------- 55
9.4 Comparación del número de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 12 meses de edad ---------- 56
9.5 Media del número de neuronas orexinérgicas en ratas SD de 3, 6, 9 y 12 meses de edad ---------- 57
9.6 Media del número de neuronas orexinérgicas en ratas *taiep* de 3, 6, 9 y 12 meses de edad ---------- 58
9.7 Distribución de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 3 meses de edad ---------- 59
9.8 Distribución de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 6 meses de edad ---------- 61
9.9 Distribución de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 9 meses de edad ---------- 63

9.10 Distribución de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 12 meses de edad---------- 65

9.11 Distribución de neuronas orexinérgicas en ratas SD de 3, 6, 9 y 12 meses de edad ---------- 67

9.11.1 Descripción morfológica de neuronas orexinérgicas en ratas SD ------ 68

9.12 Distribución de neuronas orexinérgicas en ratas *taiep* de 3, 6, 9 y 12 meses de edad ---------- 68

9.12.1 Descripción morfológica de las neuronas orexinérgicas en ratas *taiep* 69

10. DISCUSIÓN ---------- 70

11. CONCLUSIONES---------- 74

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ---------- 75

1. RESUMEN

La narcolepsia es un trastorno del sueño que se caracteriza por hipersomnolencia diurna, cataplejía, parálisis del sueño y una corta latencia al sueño con movimientos oculares rápidos (MOR). El desarrollo de la enfermedad es debido principalmente a la muerte de neuronas orexinérgicas del hipotálamo lateral. Las orexinas son neuropéptidos que modulan la regulación del sueño-vigilia, las emociones, la recompensa y la regulación de la energía. La importancia de las orexinas en la regulación del ciclo sueño-vigilia se destaca porque se sabe que la deficiencia en la señalización de las orexinas produce un fenotipo narcoléptico en humanos, en perros narcolépticos y en roedores modificados genéticamente para carecer de orexinas o sus receptores. De manera relevante, el cuadro de narcolepsia es más severo en cuanto a la sintomatología en los ratones carentes del receptor tipo 2 a orexinas que el que se presenta en los ratones carentes del gen para el receptor tipo 1.

Durante los episodios de inmovilidad, la actividad eléctrica de la corteza cerebral está desincronizada y el hipocampo muestra ritmo theta, parámetros que son iguales a los que se presentan en el sueño MOR y es similar a lo reportado en los pacientes con narcolepsia-cataplejía. Por lo anterior se ha propuesto a la rata *taiep* como un modelo de esta patología del sueño. En el caso de los humanos con narcolepsia se han descrito dos tipos. La narcolepsia tipo 1, en la que el sujeto presenta cataplejía y niveles de orexina menores <110 pg/mL en líquido cefalorraquídeo (LCR). Por otra parte, en la narcolepsia tipo 2 no se muestra cataplejía y los pacientes tienen niveles normales de orexinas en el LCR.

El objetivo de este proyecto fue el de analizar a través de un estudio inmunohistoquímico la presencia de neuronas orexinérgicas y su distribución en el cerebro de las ratas *taiep* a distintas edades y compararlas con sujetos sanos: ratas Sprague-Dawley.

Se emplearon cerebros perfundidos de ratas Sprague-Dawley (SD) y *taiep* macho de 3, 6, 9 y 12 meses de edad, cuatro. Se realizaron cortes histológicos cerebrales de 40 µM de espesor en la región del hipotálamo y se realizó la inmunohistoquímica contra orexina-A para la inmunotinción de las neuronas orexinérgicas. Se realizó un conteo de las neuronas marcadas tomando como referencias anatómicas para localizar el hipotálamo lateral, el fórnix, el III ventrículo y el área perifornical.

Los resultados muestran que el promedio de neuronas orexinérgicas inmunomarcadas disminuye con la edad en ratas SD, sin embargo, en ratas *taiep,* el promedio aumenta a los 6 meses, seguido de un decremento a los 9 meses de edad, sin que sean significativas estas diferencias. No se obtuvieron diferencias significativas entre el número de neuronas orexinérgicas de la rata *taiep* y las controles SD.

Dado que la narcolepsia es una enfermedad autoinmune y, considerando que los episodios de inmovilidad muestran un pico entre los 8 y 9 meses de edad en la rata *taiep* y luego decrecen sin cambios en la densidad de neuronas orexinérgicas, sugiere la participación de mecanismos compensadores a pesar del proceso de desmielinización progresiva en este mutante de mielina, con similitudes con las adenoleucodistrofias, considerando la mutación que tienen en la tubulina tipo β4.

En conclusión, este estudio muestra que la rata *taiep* es un modelo de narcolepsia tipo 1, con un número normal de neuronas productoras de orexinas en el hipotálamo las cuales presentan episodios de inmovilidad similares a la cataplejía humana y canina, y a los arrestos motores en los ratones manipulados genéticamente.

Estudios farmacológicos ulteriores serán fundamentales para determinar el rol de las orexinas en el ciclo sueño-vigilia y en los episodios de inmovilidad en este mutante de mielina.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Ritmos biológicos

Los organismos vivos presentan actividades biológicas cíclicas a lo largo del tiempo y con una periodicidad definida. Los ritmos biológicos son oscilaciones de una variable biológica que son generados por el denominado reloj biológico, que se encuentra localizado en el sistema nervioso central (SNC; García y cols., 2011). Es el núcleo supraquiasmático, localizado en el hipotálamo anterior por arriba del quiasma óptico, el principal oscilador que coordina los ritmos biológicos de la fisiología y el comportamiento (Klein y cols., 1991).

Los ritmos biológicos se dividen en:

- Ultradianos: Duran menos de 24 horas y suelen ser independientes de factores geofísicos. Influyen en diversas conductas animales, tales como alimentación, movimiento y exploración (Rivkees, 2007).

- Infradianos: El periodo es mayor a 24 horas, éstos pueden agruparse según dependan o no del periodo geofísico, así, existen ciclos que siguen las fases lunares, el movimiento de la Tierra, etc. Un ejemplo de ritmo infradiano es el ciclo menstrual en las mujeres, que acontece cada 28 días aproximadamente (Haus y Smolensky, 2006), otro ejemplo es la hibernación que experimentan algunos animales, el cual es un estado de inactividad y decremento del metabolismo que puede durar varios meses.

- Circadianos: Siguen un ciclo aproximado de 24 horas. Son endógenos y permanecen en equilibrio con los ciclos ambientales externos. El más conocido es el ciclo sueño-vigilia (Haus y Touitou, 1992).

2.2 Ciclo sueño-vigilia

El sueño y la vigilia son dos procesos fisiológicos que siguen un patrón biológico circadiano, es decir, cercano a las 24 horas, debido al giro de la Tierra sobre su

propio eje. El sueño, fenómeno durante el cual se incrementa el umbral para percibir estímulos del medio externo, alterna cíclicamente con un período de vigilia o estado de alerta, constituyendo el ciclo sueño-vigilia.

Aunque los mecanismos fisiológicos del sueño y la vigilia están interrelacionados, se sabe que existen diferencias evidentes en el procesamiento cerebral activo y los sistemas neuroquímicos específicos involucrados en ambos estados cerebro-mentales (Schwartz y Roth, 2008).

El electroencefalograma es el registro de las oscilaciones que muestran la actividad eléctrica cerebral, la cual se origina por los potenciales de acción y los potenciales postsinápticos excitatorios e inhibitorios de las neuronas de la corteza cerebral; se obtiene por medio de electrodos que se sitúan en la superficie del cuero cabelludo en humanos o a través de electrodos superficiales en animales durante la vigilia, el sueño o durante otras actividades. Se registran ondas de diferente morfología, amplitud y frecuencia dependiendo de la zona cerebral del registro como son: la corteza frontal, la parietal, la occipital, etc. (Da Silva, 2009).

A partir de registros del electroencefalográficos (EEG), se pueden diferenciar las distintas etapas del ciclo sueño-vigilia con base en la frecuencia de las ondas cerebrales (Figura 1).

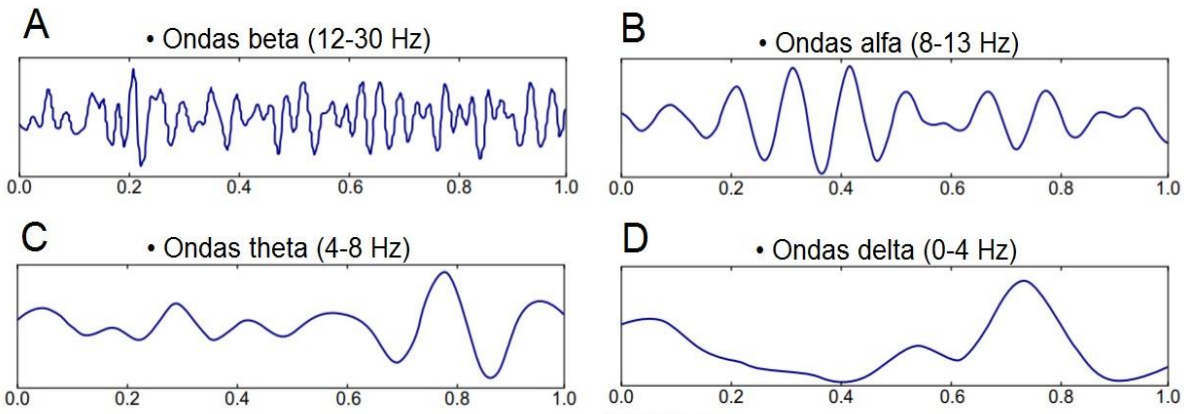

Figura 1. Tipos de ondas cerebrales en un registro electroencefalográfico en el humano. En **A)** se muestra la frecuencia de las ondas beta, que oscila entre 12-30 Hz. **B)** Las ondas alfa oscilan entre 8-13 Hz, éstas son más lentas y de mayor amplitud que las beta. **C)** Las ondas theta son ondas de mayor amplitud y menor frecuencia que van desde los 4 hasta los 8 Hz. **D)** La frecuencia de las ondas delta oscila entre 0 y 4 Hz, son las ondas de mayor amplitud y de menor frecuencia. Modificado de Abhang y cols., 2016.

La polisomnografía es una prueba que se realiza para el estudio del ciclo sueño-vigilia, la cual incluye registros de diferentes variables como la actividad cerebral por medio de electroencefalografía, la actividad ocular por medio de electrooculografía (EOG) y la actividad muscular a través de la electromiografía (EMG); también pueden registrarse las actividades cardíaca y respiratoria, los movimientos respiratorios, la pusioximetría y los movimientos de las extremidades. Gracias al empleo de esta técnica en el humano, el ciclo sueño-vigilia se ha dividido en tres etapas: la vigilia, y dos fases principales del sueño, a saber, el sueño de ondas lentas (SOL), y el sueño con movimientos oculares rápidos (MOR).

2.2.1 El estado de vigilia

La vigilia es un estado cerebral de conciencia recurrente, en el que el individuo se involucra con el ambiente externo realizando respuestas conductuales y cognitivas como la alimentación, la comunicación, la ambulación, etc. La vigilia se mantiene por la actividad de varios núcleos que van desde el tallo cerebral (bulbo raquídeo y puente), hasta la base del cerebro anterior. Las estructuras cerebrales que promueven la vigilia son: la formación reticular, que contiene neuronas que proyectan hacia distintos núcleos y estos usan como transmisores aminas

biogénicas, péptidos y acetilcolina (Brown y cols., 2012). El tálamo, que libera glutamato en sus terminales sinápticas; el locus coeruleus, núcleo principal que contiene neuronas noradrenérgicas, las cuales liberan adrenalina y noradrenalina; los núcleos del rafé, que liberan la serotonina, el área ventral tegmental, que libera dopamina; el núcleo tuberomamilar, que libera histamina y el cerebro basal anterior donde destaca el núcleo basal de Meynert, que libera acetilcolina (Saper, 1987; Saper y cols., 2001)

A partir de la década de los 90's del siglo pasado, se describió, por dos grupos diferentes de investigadores, a los péptidos denominados como orexinas por Sakurai y su grupo de investigadores (1998), e hipocretinas por el grupo de De Lecea y sus colaboradores (1998).

Las orexinas son producidas por unas 10.000 a 20.000 neuronas localizadas en la región del hipotálamo lateral (Green, 2011; Schatzberg y Debattista, 2019). La activación de las orexinas desencadena la vigilia, mientras que los bajos niveles de orexina que suceden en la noche, conducen al sueño (Diniz Behn y cols., 2008). Estos neuropéptidos son producidos por un reducido grupo de neuronas hipotalámicas (Moore, 2003; Saper y cols., 2005; Figura 2).

El núcleo paraventricular del tálamo, el núcleo arcuato, el locus coeruleus, los núcleos del rafé dorsal y el núcleo tuberomamilar, son estimulados por las orexinas, activando a los grupos de neuronas que promueven la vigilia.

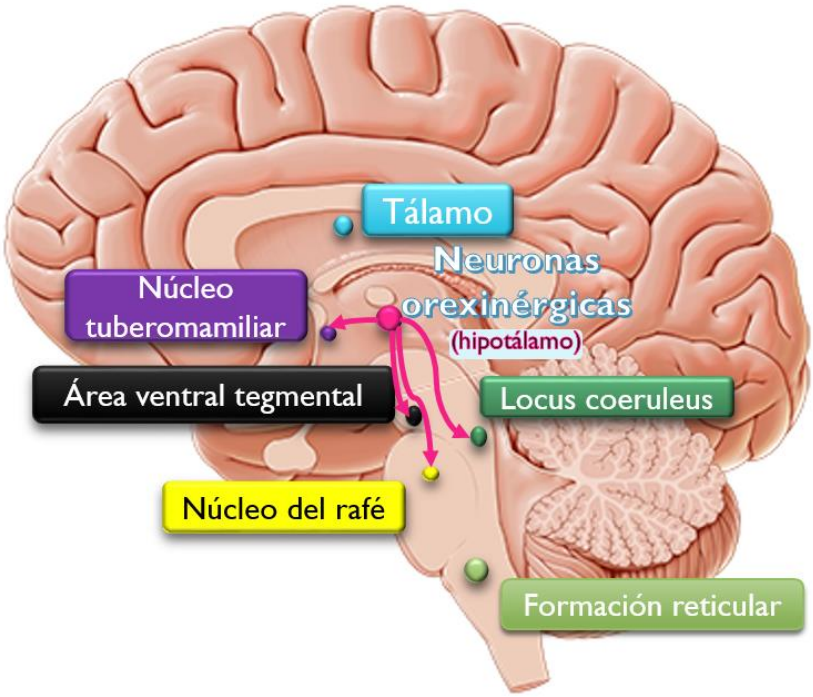

Figura 2. Núcleos involucrados en el ciclo sueño-vigilia los cuales son activados por las neuronas orexinérgicas. En la vigilia, la corteza cerebral se activa presentando actividad tipo β. Las neuronas orexinérgicas se encuentran solamente en el hipotálamo lateral, sin embargo, proyectan a todo el sistema nervioso central. Entre sus funciones, las orexinas promueven la vigilia, inervando y excitando diferentes regiones cerebrales que impulsan la atención, que incluyen al locus coeruleus y a los núcleos del rafé.

En la formación reticular se concentran las vías de proyección que se dirigen hacia el tálamo y la corteza cerebral, a este sistema se le conoce como sistema activador reticular ascendente (SARA; Moruzzi y Magoun, 1949). La vigilia se mantiene gracias a que el SARA se activa, el cual forma parte del tallo cerebral y produce una reacción de despertar en la corteza cerebral al ser estimulado (Brown y cols., 2012; Harris, 2005; Schwartz y Kilduff, 2015). El SARA está situado en el tronco cerebral y está conformado por un conjunto de neuronas de gran tamaño. El SARA recibe dos tipos de aferencias sensoriales, y va a la corteza cerebral para mantener el estado de vigilia (Magoun, 1952).

El registro electroencefalográfico de un ser humano en vigilia y con los ojos abiertos es desincronizado, presentando ritmo β predominantemente, en un rango de 12-30 Hz, actividad eléctrica de alta frecuencia y de baja amplitud (Moore, 2007) y reflejando diferencias en el tiempo del procesamiento cognitivo, motor y de las funciones perceptivas (Fuller y cols., 2006).

2.2.2 El estado de sueño

En los seres humanos, el sueño es el principal periodo de quietud con una conducta específica, el cual es un estado biológico que se caracteriza por adoptar una postura especie-específica de reposo con los ojos cerrados en los seres humanos y en la mayoría de los mamíferos. Es un estado fácilmente reversible, lo cual lo diferencia de estados patológicos como son el coma o el estupor (Vassalli y Dijk, 2009). El sueño se define en función de la conducta del individuo y de los cambios fisiológicos que ocurren en los diferentes estados de actividad cerebral (Chokroverty, 2011). Durante el sueño se presentan cambios en la actividad respiratoria, en el ritmo cardíaco, la temperatura corporal, entre otras variables fisiológicas. Existen dos tipos de sueño en el ser humano: el sueño de ondas lentas (SOL), y el sueño con movimientos oculares rápidos (MOR; Manni, 2005).

2.2.2.1 El sueño de ondas lentas

En el humano, el sueño de ondas lentas (SOL) no es un proceso homogéneo, sino que se organiza cíclicamente en distintas fases, cada una se caracteriza por acontecimientos identificables asociados con cambios somáticos y patrones del EEG que los caracteriza (Rodenbeck y cols., 2006). En 1968, Rechtschaffen y Kales dividieron ese estadio del sueño en cuatro fases y las dos últimas representaban el sueño de ondas lentas. Sin embargo, en 2007, la Academia Americana de Medicina del Sueño (AASM, de sus siglas en inglés) redujo esa subdivisión del SOL a tres, al fusionar entonces los estadios 3 y 4 en una sola fase (Moser y cols., 2009). El sueño de ondas lentas se divide entonces en tres estadios, N1, N2 y N3. La etapa N1, es un estado de transición desde la vigilia al sueño, caracterizado por la pérdida de la

actividad alfa y la aparición de ondas de frecuencia mixta: beta de 12-30 Hz en el EEG con actividad en la banda de frecuencia theta (4-8 Hz). La etapa N1 progresa hacia la segunda fase, N2, que se caracteriza porque el EEG muestra husos de sueño prominentes, con una frecuencia de 12 a 15 Hz y los complejos K. Finalmente, la etapa N3, la del sueño profundo, donde el EEG muestra ondas de baja frecuencia y alta amplitud, de 0 a 4 Hz (Shrivastava, 2014).

Se ha descrito que en el sueño de ondas lentas se activan las neuronas del núcleo ventrolateral preóptico del hipotálamo (Hofman y Talamini, 2015). Las neuronas del núcleo ventrolateral preóptico liberan el neurotransmisor ácido γ-aminobutírico (GABA), el cual es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (Sherin y cols., 1998). Al activarse este núcleo, disminuye la función de los núcleos activadores de la vigilia, iniciándose así la transición hacia el sueño de ondas lentas (Saper y cols., 2005). Interviene también la inactivación de los núcleos serotoninérgicos del núcleo del rafé dorsal del tronco cerebral, el núcleo del fascículo solitario y del prosencéfalo basal (Moore, 2003). Se desactiva el sistema reticular activador ascendente, lo cual permite la aparición de los ritmos tálamo-corticales por la inhibición de las fibras sensoriales ascendentes (Figura 3). El SOL también se caracteriza por una relajación de la musculatura corporal, esto es hipotonía; así como una disminución de la frecuencia cardíaca, de la presión sanguínea, de la temperatura corporal y de la actividad cerebral de manera progresiva (Dijk, 2009).

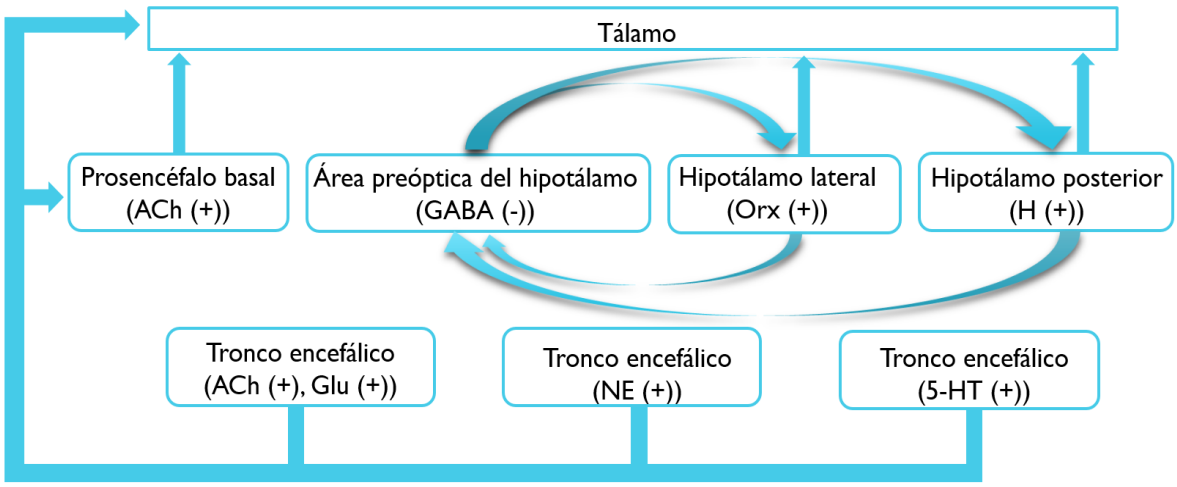

Figura 3. Estructuras y vías responsables de la activación del sueño de ondas lentas. La excitación talamo-cortical se genera mediante un conjunto de proyecciones ascendentes desde el tronco cerebral rostral, el hipotálamo y el prosencéfalo basal (flechas rectas). Estas proyecciones ascendentes, están relacionadas con la activación, emplean los neurotransmisores acetilcolina (ACh), glutamato (Glu), norepinefrina (NE), serotonina (5HT), histamina (H) y orexina (Orx). Las neuronas que promueven el sueño en el área preóptica liberan ácido γ-aminobutírico (GABA) y forman los circuitos recíprocos inhibidores con sistemas de excitación hipotalámica (flechas curvas). Modificado de Rosenwasser, 2009.

2.2.2.2 El sueño con movimientos oculares rápidos (MOR)

En el transcurso de una noche, el sueño de ondas lentas alterna con el sueño con movimientos oculares rápidos cada 90 minutos en el humano, mientras que en la rata ambas etapas alternan cada 10 a 13 minutos (Trachsel y cols., 1991; Vivaldi y cols., 1994; Datta y Hobson, 2000). Sin embargo, en cada ciclo se alarga la duración del sueño MOR desde 5 a 7 minutos respecto del primer episodio, hasta alcanzar los 30 minutos o más antes de despertar (Peraita-Adrados, 2005; McCarley, 2007).

Éste se caracteriza por presentar episodios de movimientos oculares rápidos (MOR), atonía muscular, además de una actividad cortical desincronizada con una frecuencia de 12-30 Hz registrada en el EEG. De tal forma que durante el sueño MOR el EEG muestra ondas cerebrales rápidas y desincronizadas, de baja amplitud, 100-150 μv, y alta frecuencia, actividad rápida similar a la vigilia pero con atonía muscular, por lo que también se le conoce como sueño paradójico (Jouvet, 1965). El sueño MOR ocurre por activación inicial sobre el núcleo reticular pontis oralis, cuyo estímulo se propaga a los núcleos tegmentales pedúnculo-pontinos y

latero-dorsales y regresa nuevamente a la corteza cerebral (Sanford y cols., 2003). Durante el sueño MOR la frecuencia cardíaca y la respiratoria son irregulares, y la temperatura corporal no está regulada (Rama y cols., 2005).

2.3 El ciclo sueño-vigilia en la rata como modelo experimental

Un modelo animal común en investigaciones acerca del ciclo sueño-vigilia, es la rata. Este animal es polifásico, es decir, tiene periodos de vigilia relativamente breves que se intercalan con episodios de sueño.

En la rata, el registro electroencefalográfico durante la vigilia se caracteriza por una actividad desincronizada, con ondas de alta frecuencia y baja amplitud en el rango beta de 12-30 Hz, presentando actividad muscular y ocular según la actividad que esté realizando el animal.

El sueño en la rata se ha clasificado en: sueño de ondas lentas (SOL) y sueño MOR.

1. Sueño de ondas lentas. En el EEG, el SOL está caracterizado por ondas delta de alta amplitud y baja frecuencia (de 0-4 Hz). El animal presenta hipotonía muscular, regularidad en la frecuencia respiratoria y cardíaca, además de poseer una postura característica de descanso.
2. Sueño MOR. Se observan ondas rápidas de alta frecuencia y baja amplitud similares a las que se presentan en la vigilia, con actividad beta en corteza cerebral y theta en el hipocampo (de 4-8 Hz). En el sueño MOR, la rata presenta ausencia de tono muscular y contracciones musculares paroxísticas acompañadas de movimientos oculares rápidos conjugados y ritmos cardíaco y respiratorio irregulares (Jouvet, 1969).

2.4 Regulación de la vigilia y el sueño

La organización rítmica de la que depende la duración de cada una de las fases y del ajuste al ciclo geofísico, está controlada por el hipotálamo y por estructuras relacionadas a éste, como el núcleo supraquiasmático (Moore, 2007).

En el tronco cerebral, diencéfalo y prosencéfalo basal, existen centros cuya influencia es contrapuesta sobre el tálamo y la corteza cerebral; cuando predomina el sistema activador reticular, el individuo está en vigilia, alerta, y cuando su influencia decae, los sistemas inhibidores inducen el estado de sueño (Guyton, 2011). Los mismos sistemas de excitación que son inhibidos por las neuronas promotoras del sueño también sirven para interrumpir estos procesos de sueño y revertir a un estado de vigilia (Saper y cols., 2005).

Las transiciones fisiológicas entre la vigilia y el sueño están reguladas por un componente circadiano y otro homeostático (Gvilia, 2006). El factor homeostático se refiere a una mayor propensión a la somnolencia con períodos anteriores más largos de vigilia; mientras que el factor circadiano se refiere a variaciones en el estado de alerta fisiológico que varía cíclicamente con la hora del día; así, el componente homeostático favorece el sueño y el circadiano induce el estado de vigilia (Chokroverty, 2010; véase Figura 4). En forma homeostática, la vigilia prolongada promueve la generación del sueño; el núcleo preóptico medio (MnPN, por sus siglas en inglés) y el área preóptica ventrolateral (vlPOA, por sus siglas en inglés), contienen neuronas activadoras que exhiben mayores descargas durante el sueño, en comparación cuando el sujeto se encuentra despierto (Schwartz y Roth, 2008).

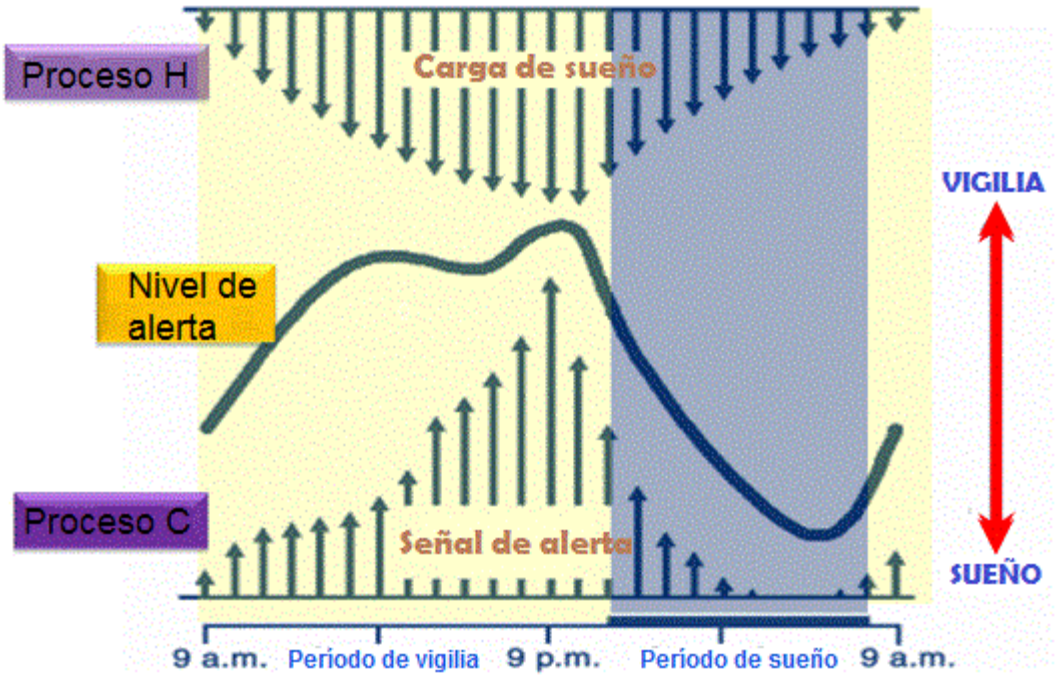

Figura 4. Alternancia entre la vigilia y el sueño por 2 procesos: homeostático (proceso H) y circadiano (proceso C). El proceso H representa la carga de sueño, y está determinado por la secuencia temporal de estados del comportamiento. El proceso H aumenta durante el despertar y disminuye a medida que se produce el sueño. Por el contrario, el proceso C está controlado en su totalidad por el núcleo supraquiasmático (SCN), el marcapasos circadiano, independientemente del estado conductual. La línea continua representa el curso resultante del nivel de alerta en función del tiempo durante el día. Modificado de Habbal y cols., 2009.

Algunas investigaciones indican que las neuronas del núcleo preóptico medio (MnPN) y del área preóptica ventrolateral (vlPOA) funcionan para promover el sueño de ondas lentas a través de la modulación inhibitoria descendente de los sistemas de excitación localizados en el hipotálamo posterior y el tronco encefálico (Chokroverty, 2010).

La adenosina, un nucleósido de purina, es una de las moléculas involucradas en la regulación homeostática del sueño; diversos estudios han planteado la hipótesis de que ésta molécula promueve el sueño (Radulovacki y cols., 1984; Strecker y cols., 2000), inhibiendo los sistemas activadores y estimulando los sistemas generadores de sueño, fungiendo como un modulador de la somnolencia. Durante la vigilia, la adenosina extracelular se acumula selectivamente en el

prosencéfalo basal y en la corteza cerebral, promoviendo la transición de la vigilia hacia el sueño de ondas lentas mediante la inhibición de la vigila (Strecker y cols., 2000). Esta relación no es evidente en otras regiones del cerebro, lo que sugiere que la adenosina actúa como un somnífero local justo en la región del prosencéfalo basal (Saper y cols., 2005).

2.4.1 Principales neurotransmisores involucrados en la regulación del ciclo sueño-vigilia

Dentro del tallo cerebral y el hipotálamo existen poblaciones de neuronas que promueven la vigilia mediante la acción de diferentes neurotransmisores como son la noradrenalina, la serotonina, la histamina o la orexina (Franco y cols., 2012).

2.4.1.1 Noradrenalina

Se sabe que el locus coeruleus es el principal núcleo noradrenérgico de proyecciones eferentes a la mayoría de las estructuras del cerebro anterior (Aston-Jones y Bloom, 1981). Estas neuronas muestran una tasa de disparo mayor durante la vigilia en comparación al SOL y en el sueño MOR una tasa de disparo prácticamente nula (Aston-Jones y Bloom, 1981; Takahashi y cols., 2010).

2.4.1.2 Serotonina

Es un neurotransmisor sintetizado en las neuronas serotoninérgicas en el sistema nervioso central (Dahlstrom y Fuxe, 1964). Las neuronas serotoninérgicas están distribuidas en los núcleos del rafé, que son grupos de neuronas que se extienden a lo largo del tallo cerebral y proyectan a diferentes regiones del cerebro. Investigaciones realizadas en gatos y ratas muestran que la tasa de disparo de las neuronas serotonérgicas y la concentración de serotonina extracelular en el rafé dorsal es más alta durante la vigilia disminuyendo progresivamente a lo largo del SOL y del sueño MOR (Urbain y cols., 2006; Monti, 2010).

2.4.1.3 Histamina

Es una molécula derivada de la histidina. Las neuronas histaminérgicas en el cerebro de mamíferos se encuentran en el área hipotalámica posterior, en el núcleo

tuberomamilar, mandando desde allí axones hacia todo el sistema nervioso central (Watanabe y cols., 1984). Estas neuronas están activas durante la vigilia y disminuyen su tasa de disparo durante el SOL y el sueño MOR. Existen tres tipos de receptores histaminérgicos en el cerebro: H1, H2 y H3. La estimulación de H1 y H2, promueven la vigilia (Ramesh y cols., 2004). Por otro lado, el receptor H3 actúa como un autorreceptor con efecto negativo, es decir, la propia histamina inhibe a través de este receptor su propia liberación (Díaz-Negrillo, 2013).

Otras neuronas, localizadas en núcleos específicos del hipotálamo y el tallo cerebral están involucradas en el inicio y mantenimiento del sueño. Éstas contienen acetilcolina y GABA, que proyectan y modulan la actividad de los núcleos involucrados en la regulación de la vigilia (Saper y cols., 2010).

2.4.1.4 Acetilcolina

Es un neurotransmisor específico que actúa como mensajero entre neuronas del sistema nervioso. Participa en procesos como memoria, aprendizaje, neuromodulación, enfermedades neurodegenerativas, funciones musculares, etc., (Díaz-Negrillo, 2013). Estudios electrofisiológicos en el cerebro basal anterior, en el tegmento pedunculopontino y en el núcleo laterodorsal, mostraron que las neuronas colinérgicas descargan a tasas significativamente más altas durante la vigilia y el sueño MOR en comparación con el SOL (Steriade y cols., 1990). La liberación de acetilcolina en el cerebro basal anterior y en regiones como el neocórtex y el tálamo, es mayor durante la vigilia que durante el sueño MOR (Vazquez y Baghdoyan, 2001).

2.4.1.5 Ácido γ-aminobutírico (GABA)

Es el principal neurotransmisor inhibidor en el sistema nervioso central de los mamíferos (Watanabe y cols., 2002). En el núcleo preóptico medio y en el área preóptica ventrolateral, existen neuronas GABAérgicas, las cuales exhiben un patrón específico de descarga elevada durante el SOL y el sueño MOR (Szymusiak y cols., 1998; Suntsova y cols., 2002). En estudios se ha demostrado que las

neuronas GABAérgicas promueven el sueño por medio de la inhibición de los sistemas involucrados en la vigilia como el sistema orexinérgico y los sistemas monoaminérgicos (Szymusiak y McGinty, 2008).

2.5 Cambios fisiológicos durante el sueño

La temperatura, la presión sanguínea, los niveles de oxígeno, de dióxido de carbono y la glucosa en la sangre son generalmente altos y muy variables durante el período de vigilia. Sin embargo, durante el sueño de ondas lentas las demandas fisiológicas se reducen y hay un descenso en la temperatura, el tono muscular, los movimientos corporales, la respiración, la frecuencia cardíaca y la presión arterial. Todos los parámetros alcanzan sus valores mínimos durante este período. Por el contrario, durante el sueño MOR, los valores se elevan hasta niveles casi tan altos como los que se presentan durante la vigilia (Purves, 2001).

3. ANTECEDENTES GENERALES

3.1 Clasificación de los trastornos del sueño

La Clasificación Internacional de los Trastornos del Sueño, en su tercera edición (2014), distingue siete categorías principales de los trastornos del sueño que son: el insomnio, trastornos respiratorios relacionados con el sueño, trastornos centrales de hipersomnolencia, trastornos del ritmo circadiano, trastornos de movimiento relacionados con el sueño, parasomnias y otros trastornos del sueño (Darien; American Academy of Sleep Medicine, 2014; véase Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación internacional de los trastornos del sueño

CLASIFICACIÓN GENERAL	TIPOS
Insomnio	• Insomnio crónico • Insomnio de corta duración
Trastornos respiratorios relacionados con el sueño	• Síndrome de apnea obstructiva del sueño • Síndrome de apnea central del sueño • Trastornos de hipoventilación relacionados con el sueño
Trastornos centrales de hipersomnolencia	• Narcolepsia tipo1 y tipo 2 • Hipersomnolencia idiopática • Síndrome de Kleine-Levine • Hipersomnia por un trastorno médico • Hipersomnia debido a un medicamento • Hipersomnia asociada a un trastorno psiquiátrico • Síndrome de sueño insuficiente
Trastornos del ritmo circadiano	• Trastorno de retraso de la fase de sueño • Trastorno de avance de la fase de sueño • Trastorno irregular del ciclo sueño-vigilia • Trastorno laboral debido a cambio de turno en el trabajo • Trastorno del desfase de horario (*jet-lag*) • Trastorno circadiano del sueño-vigilia no especificado
Trastornos de movimiento relacionados con el sueño	• Síndrome de piernas inquietas • Bruxismo relacionado con el sueño • Trastorno de movimiento rítmico relacionado con el sueño • Trastorno del movimiento relacionado con el sueño debido a un medicamento.
Parasomnias	• Parasomnias relacionadas con sueño no MOR • Parasomnias relacionadas con sueño MOR • Otras parasomnias (véase tabla 2)
Otros trastornos del sueño	

3.2.1 Insomnio

La característica esencial del insomnio es la dificultad para iniciar o mantener el sueño. Este es dividido en dos categorías: primario y crónico según la Clasificación Internacional de Enfermedades versión 10 (World Health Organization, 1992).

Específicamente, el trastorno por insomnio crónico se asocia con conductas desadaptativas que representan los principales factores perpetuadores del insomnio tales como el estrés, trastornos de ansiedad y depresión, medicamentos, malos hábitos de sueño, etc. (Perlis y cols., 1997). Estos factores deben abordarse a través de una terapia cognitivo-conductual para lograr un resultado exitoso a largo plazo (Williams y cols., 2013).

3.2.2 Trastornos respiratorios relacionados con el sueño

Son los trastornos que implican dificultades respiratorias por interrupciones en los patrones normales de respiración durante el sueño (Iber, 2005). Se dividen en cuatro secciones: apnea obstructiva del sueño, apnea central del sueño, síndrome de hipoventilación y trastorno de hipoxemia relacionado con el sueño. Estas condiciones, a su vez, pueden asociarse con una mala calidad del sueño y por alteraciones en los niveles del intercambio de gases durante éste como el O_2, CO, etc.

3.2.3 Trastornos del ritmo circadiano

Estos trastornos son causados por alteraciones en el ritmo circadiano por una desalineación del ritmo circadiano endógeno y el entorno con consecuencias contraproducentes en el sueño y otros aspectos de la salud, por ejemplo, disfunción en el metabolismo, deterioro cognitivo, anomalías cardiovasculares, disfunciones gastrointestinales y genitourinarias (Klerman, 2005).

Los trastornos del ritmo circadiano incluyen retraso de la fase de sueño, trastorno de avance de la fase de sueño, ciclo sueño-vigilia irregular, ciclo sueño-

vigilia diferente a 24 horas, trastorno de sueño debido a cambio de turno en el trabajo, trastorno de ciclo sueño-vigilia circadiano no especificado (Sateia, 2014).

3.2.4 Las parasomnias

Son un grupo de trastornos que se caracterizan en función de la etapa de sueño en la que se producen (véase Tabla 2). Las parasomnias abarcan movimientos complejos relacionados con el sueño, comportamientos, emociones, percepciones, sueños y actividad del sistema nervioso autónomo que resultan de lesiones físicas, alteraciones del sueño, efectos adversos para la salud y psicosociales (Xie y cols., 2017).

Tabla 2. Clasificación de las parasomnias

Parasomnias relacionadas con sueño de ondas lentas
Despertares confusos
Sonambulismo
Terrores nocturnos
Trastorno alimentario relacionado con el sueño
Parasomnias relacionadas con sueño MOR
Trastorno del comportamiento del sueño MOR
Parálisis del sueño aislada recurrente
Pesadillas
Otras parasomnias
Síndrome de la cabeza explosiva
Alucinaciones relacionadas con el sueño
Enuresis del sueño
Parasomnia debido a un desorden médico
Parasomnia debida a un medicamento o sustancia
Parasomnia no especificada

3.2.5 Los trastornos del movimiento durante el sueño

Estos trastornos se diagnostican cuando el paciente experimenta insomnio y angustia y, por ende, fatiga diurna excesiva o sueño no reparador debido a

movimientos simples y estereotipados que ocurren durante el sueño o a inicios de éste (Sateia, 2014). En este tipo de trastornos se incluyen: los trastornos de movimientos periódicos de las extremidades, síndrome de piernas inquietas, calambres relacionados con el sueño, bruxismo, trastornos rítmicos del movimiento durante el sueño y mioclono infantil benigno del sueño (Fahn y Chokroverty, 2013).

3.2.6 Los trastornos de hipersomnolencia de origen central

La hipersomnia consiste en una excesiva cantidad de sueño con incremento de la somnolencia diurna y fatiga excesiva. Se define como la incapacidad para mantenerse despierto y alerta durante la vigilia, lo que resulta en períodos de necesidad irreprimible de sueño o lapsos involuntarios de somnolencia independientemente de la hora del día (American Academy of Sleep Medicine, 2014). Dicha somnolencia puede ser causada por afecciones médicas, otros trastornos del sueño, sustancias prescritas y/o ilícitas, demandas laborales, familiares, así como tiempo de sueño insuficiente (Khan y Trotti, 2015). Muchas enfermedades neurológicas pueden asociarse a excesiva somnolencia diurna dentro de las que podemos destacar la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Niemann-Pick tipo IV y otras demencias (Mahowald y cols., 2005). La reclasificación reciente de los trastornos del sueño divide la hipersomnolencia en ocho categorías principales: narcolepsia tipo 1, narcolepsia tipo 2, hipersomnia idiopática, síndrome de Kleine-Levin, hipersomnia debido a un desorden médico, hipersomnia asociada a un trastorno psiquiátrico, y el síndrome de sueño insuficiente (Khan y Trotti, 2015).

3.2.7 Trastorno prototípico de hipersomnolencia: narcolepsia

La narcolepsia es un trastorno neurológico que afecta el control entre el sueño y la vigilia, es una enfermedad crónica caracterizada por una somnolencia diurna excesiva y episodios de atonía muscular denominada cataplejía, que se define por la aparición súbita y reversible de episodios de atonía muscular bilateral desencadenados por emociones (Pelayo y cols., 2010). Se presentan también otros

síntomas como la parálisis de sueño, alucinaciones hipnagógicas e hipnopómpicas (Andlauer y cols., 2013).

Adicionalmente, los pacientes presentan una corta latencia al inicio del sueño MOR, de entre 5 y 8 minutos y 2 o más periodos de inicio de sueño MOR al aplicarse un estudio de latencias múltiples del sueño.

Actualmente, la clasificación Internacional de los Trastornos del Sueño, a través de la Asociación Americana de Medicina del sueño, divide la narcolepsia en 2 tipos:

- Narcolepsia tipo 1: El paciente presenta somnolencia excesiva diurna o episodios de sueño diurno en combinación con una o dos de las siguientes características:
  - Cataplejía, que consiste en episodios breves de debilidad o parálisis muscular repentina e incontrolable que suelen desencadenarse por alguna emoción.
  - Niveles bajos o ausentes de orexina-A en el líquido cefalorraquídeo (LCR): por debajo de 110 pg/mL. Evaluados por radioinmunoensayo.
- Narcolepsia tipo 2: El individuo presenta somnolencia excesiva diurna, latencia corta al sueño MOR además de las siguientes características:
  - Sin cataplejía, no presentan debilidad muscular o atonía provocada por emociones.
  - Niveles normales de orexina-A en líquido cefalorraquídeo.

La somnolencia excesiva diurna suele ser el primer síntoma en aparecer y consiste en una tendencia anormal a dormirse en situaciones de monotonía (Nishino, 2007; Guilleminault, 1994). El segundo síntoma es la cataplejía que se define por la aparición súbita y reversible de episodios de atonía muscular bilateral desencadenados por emociones, con más frecuencia por la risa, la alegría, el asombro o el enfado (Pelayo y cols., 2010). Desde el punto de vista electrofisiológico durante la atonía, la corteza cerebral y el electromiograma muestran una actividad

similar a la mostrada durante el sueño MOR, es decir, el EEG en la corteza cerebral tiene una frecuencia de entre 12-30 Hz y ritmo theta (4-8 Hz) en el hipocampo (Eguibar y Cortés, 2001). Los episodios repentinos de sueño pueden ocurrir durante cualquier tipo de actividad y a cualquier hora del día.

Gracias a diferentes grupos de investigadores, se dio a conocer que la mayoría de los casos de narcolepsia-cataplejía humana están asociados con la deficiencia de orexina (Nishino y cols., 2000; Peyron y cols., 2000; Thannickal y cols., 2000).

La narcolepsia-cataplejía es debida principalmente a la muerte de neuronas orexinérgicas en el hipotálamo lateral perifornical (Honda y cols., 2009; Nishino y cols., 2010; véase Figura 5) y se ha asociado a niveles bajos de orexina en el líquido cefalorraquídeo (Mignot y cols., 2002; Nishino y cols., 2010). En estudios de necropsia, el número de células positivas se ve disminuido en pacientes afectados con narcolepsia-cataplejía (Thannickal y cols., 2000).

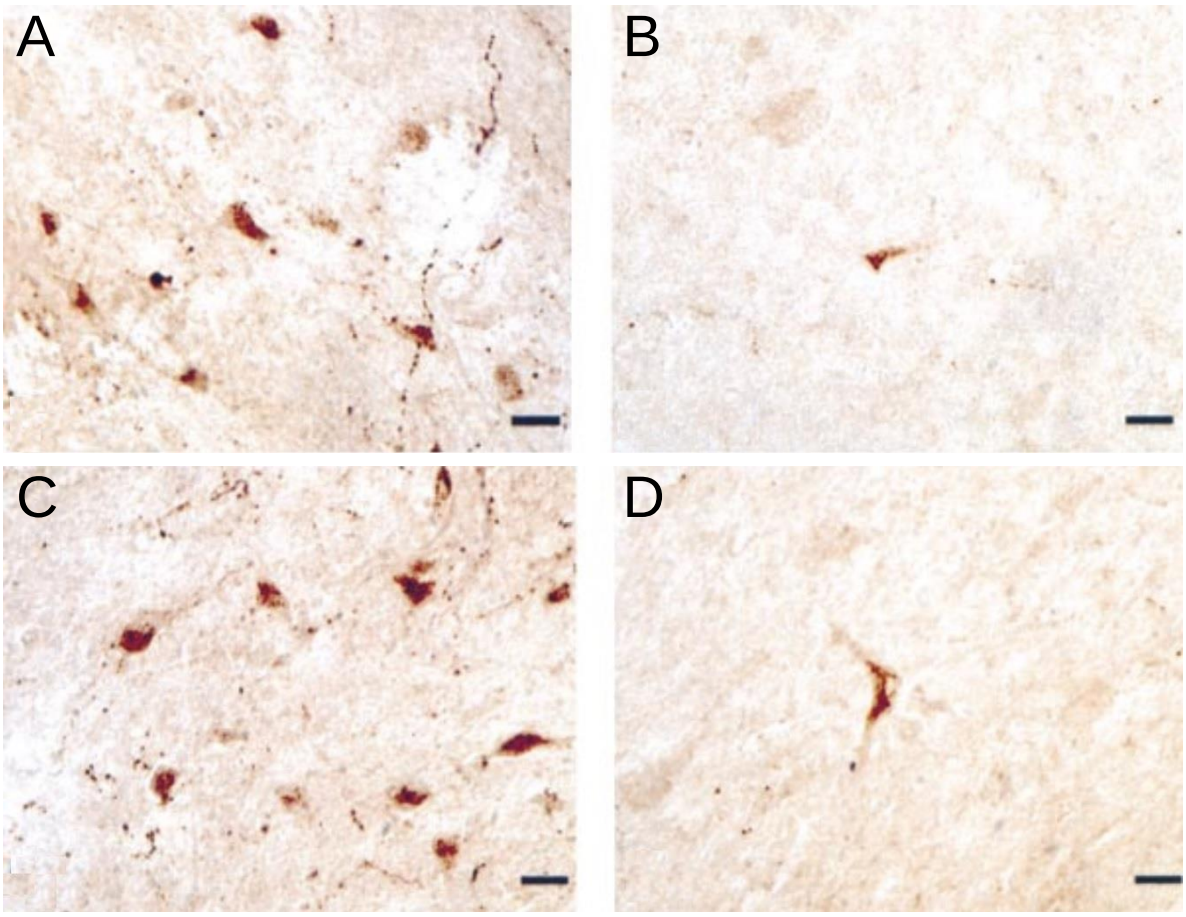

Figura 5. Distribución de neuronas orexinérgicas en regiones hipotalámicas perifornical y dorsomedial en humano. En **A)** y **C)** se muestran células de orexina inmunomarcadas en sujetos normales, y en **B)** y **D)** en sujetos narcolépticos. Cortes coronales = 40 µm; barra = 25 µm. Modificado de Thannickal y cols., 2000.

Después de varios estudios, la narcolepsia-cataplejía se ha caracterizado por una pérdida de aproximadamente el 90% de las neuronas inmunopositivas para orexina (Thannickal y cols., 2000; Ripley y cols., 2001). Sin embargo, en pacientes con narcolepsia tipo 2, el decremento global en el número de cuerpos neuronales inmunorreactivos es de tan solo el 33% (Thannickal y Siegel, 2009; Figura 6).

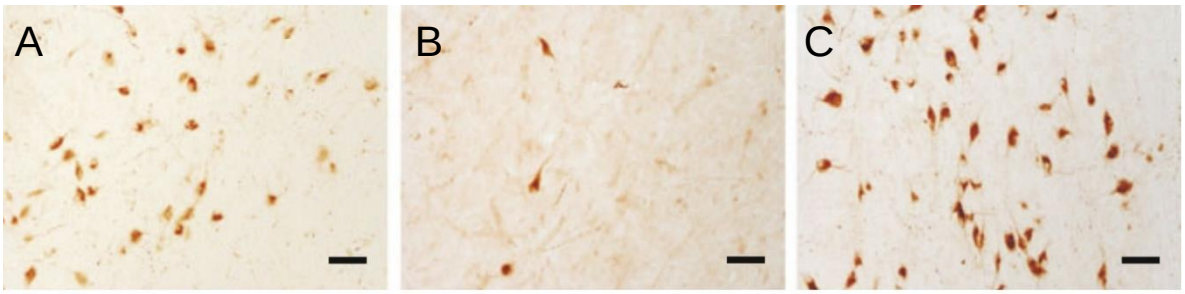

Figura 6. Células orexinérgicas en el núcleo hipotalámico dorsomedial en individuos normales y con narcolepsia con y sin cataplejía. El número de neuronas orexinérgicas disminuye considerablemente en pacientes con narcolepsia-cataplejía. **A)** Corte histológico cerebral de un individuo con el número normal de neuronas orexinérgicas. **B)** Corte histológico cerebral de un paciente con narcolepsia tipo 1. **C)** Corte histológico cerebral de un paciente con narcolepsia tipo 2. Barra = 50 µm. Modificado de Thannickal y Siegel, 2009.

La prevalencia de la narcolepsia-cataplejía se encuentra entre 25 y 50 por cada 100,000 personas en la población mundial. La narcolepsia-cataplejía tiene una incidencia de 0.74 por cada 100,000 personas por año (Longstreth y cols., 2007; Hublin y cols., 1994). Se presenta en personas de 25-35 años de edad principalmente, afectando a hombres y mujeres por igual (Aldrich, 1992). Las prevalencias más altas han sido reportadas en Japón; Honda en 1979 describió una frecuencia de 160 casos por cada 100,000 niños de entre 12-16 años. Se ha reportado una cifra mucho más alta de 590 por cada 100,000 adultos en Japón (Hublin y cols., 1994), lo que implica factores genéticos característicos y quizá medioambientales que la desencadenan.

Se han sugerido determinados mecanismos inmunológicos como los responsables de la pérdida selectiva de neuronas orexinérgicas ya que la narcolepsia está asociada a antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) en leucocitos y en las células T (Bernard-Valnet y cols., 2016). Se ha descrito que la asociación con alelos HLA, como el HLA DQB1*0602, se encuentra en aproximadamente el 90% de los pacientes con narcolepsia y que el simple hecho de llevar este gen aumenta el riesgo de padecer narcolepsia alrededor de 200 veces (Mignot y cols., 1993; Mignot y cols., 1994). Se ha descrito que la narcolepsia puede originarse a partir de una degeneración autoinmune de las neuronas productoras de orexinas (Thannickal y cols., 2000).

Un análisis del genoma mostró que la narcolepsia humana exhibe una mutación genética específica del locus alpha de los receptores del linfocito T, haciendo que el sistema autoinmune ataque a las neuronas orexinérgicas, llegando a la conclusión de que la ausencia de neuronas productoras de orexinas en pacientes con narcolepsia se deba a un proceso autoinmune (Hallmayer y cols., 2009).

Los factores ambientales juegan un papel importante para desencadenar el proceso de la enfermedad, las infecciones debidas a estreptococos o por el virus de la influenza H1N1 están asociados con el inicio de los síntomas de la narcolepsia (Mignot, 1998). La aparición de la cepa pandémica de gripe H1N1 en 2009 provocó el desarrollo y la distribución rápida de vacunas que contenían antígenos del virus. Estas vacunas incluyeron, entre otras, a la denominada 'Pandemrix', vacuna que se administró a 30 millones de pacientes aproximadamente en Europa y a la cual se asociaron algunos casos de narcolepsia (Nellore y Randall, 2016). Un estudio propuso que los pacientes narcolépticos tienen células T que reaccionan de forma cruzada con el péptido pre-pro-orexina, con los receptores a orexina o con células que expresan éstos, además que los pacientes narcolépticos tienen células T que reaccionan tanto al péptido pre-pro-orexina como a la hemaglutinina expresada por el virus H1N1 (De la Herrán-Arita y cols., 2013).

3.3 Las orexinas

En 1998, se identificaron 2 nuevos péptidos en el sistema nervioso central, dichas moléculas fueron descubiertas simultáneamente por dos grupos independientes de investigadores (De Lecea y cols., 1998; Sakurai y cols., 1998), cada uno se denominó de manera diferente: hipocretina, nombre que proviene de hipotálamo y su parecido con el péptido secretina por el grupo de De Lecea y sus colaboradores; y orexinas por el grupo de Sakurai y colaboradores, debido a que la etimología proviene de la palabra griega *orexis*, que significa 'apetito', pues se observó que tras su administración por vía intracerebroventricular, aumentaba la ingesta de

alimento. Son hormonas neuropeptídicas que se sintetizan en el hipotálamo, activan núcleos histaminérgicos, noradrenérgicos, serotoninérgicos y colinérgicos del hipotálamo y del tallo cerebral manteniendo así la vigilia (Ohno y Sakurai, 2008).

Estos dos péptidos son la orexina A y la orexina B, las cuales tienen características diferentes, pero ambas se derivan de un mismo neuropéptido precursor, la pre-pro-orexina (Alvarez y Sutcliffe, 2002; De Lecea y cols., 1998; Sakurai y cols., 1998). En principio se identificaron ambos péptidos como ligandos peptídicos endógenos para dos receptores huérfanos acoplados a proteínas G. La orexina A de los mamíferos es un péptido compuesto de 33 aminoácidos y contiene dos puentes disulfuro; mientras que la orexina B es un péptido lineal de 28 aminoácidos (De Lecea y cols., 1998; Trivedi y cols., 1998; Nambu y cols., 1999).

El ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para el precursor de estos péptidos se expresa abundante y específicamente en el hipotálamo lateral y en áreas adyacentes; una región involucrada en la regulación central del comportamiento alimentario y en la homeostasis energética (Sakurai y cols., 1998).

Posteriormente se identificaron los receptores en los cuales las orexinas ejercen su acción denominados tipo 1 (OX_1R) y tipo 2 (OX_2R), que pertenecen a la familia de los receptores metabotrópicos acoplados a las proteínas G. Se ha demostrado que se acoplan a miembros de tres de las familias de proteínas G heterotriméricas, concretamente, el receptor tipo 1, se acopla a proteínas G_q, por su parte, el receptor tipo 2 se acopla a proteínas $G_{i/o}$ y G_s, y puede o no estar acoplado a proteínas G_q (Kukkonen y Leonard, 2014). La orexina A se une a ambos receptores con la misma afinidad y la orexina B, se une principalmente al receptor OX_2R (Langmead y cols., 2004; figura 7).

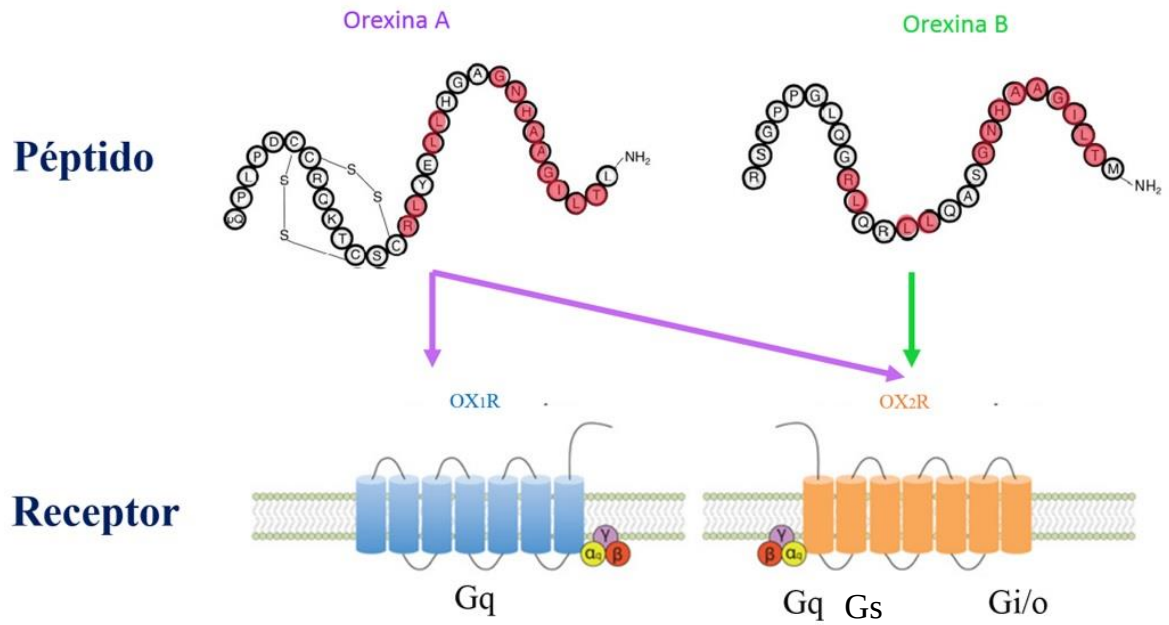

Figura 7. Representación esquemática del sistema orexinérgico. La orexina-A es un péptido compuesto de 33 aminoácidos unidos por dos puentes disulfuro y la orexina-B es un péptido lineal compuesto de 28 aminoácidos. Existen 2 receptores para orexinas: OX_1R y OX_2R. OX_1R está acoplado a proteínas G_q y tiene mayor afinidad a la orexina-A, mientras que OX_2R está acoplado a proteínas de tipo G_s, $G_{i/o}$ y tiene afinidad similar tanto para orexina-A como para orexina-B. Abreviaturas: G_q: subunidad de la proteína G heterotrimérica que activa la fosfolipasa C y ésta, a su vez, hidroliza a un fosfatidilinositol bifosfato convirtiéndolo en diacilglicerol e inositol trifosfato; $G_{i/o}$: subnidad de la proteína G heterotrimérica que inhibe la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) a partir de trifosfato de adenosina (ATP); G_s: subunidad de la proteína G heterotrimérica que activa la vía dependiente de AMPc por medio de la activación de la enzima adenil ciclasa; OX_1R: receptor a orexinas tipo 1; OX_2R: receptor a orexinas tipo 2. Modificada de Sakurai y cols., 1998; Equihua y cols., 2013.

3.3.1 Las neuronas productoras de orexinas

Las neuronas orexinérgicas se sitúan exclusivamente en el hipotálamo lateral perifornical y en el hipotálamo posterior. Las áreas dorsal, perifornical, posterior y lateral son conocidas como los orígenes principales de las orexinas A y B (De Lecea y cols., 1998; Peyron y cols., 1998; Sakurai y cols., 1998), de donde proyectan a diferentes áreas del sistema nervioso central, principalmente a los núcleos noradrenérgicos, monoaminérgicos, serotoninérgicos e histaminérgicos, los cuales están implicados en la activación de la vigilia (De Lecea y cols., 1998). Las fibras de orexina proyectan a prácticamente todas las áreas del hipotálamo, incluidos el núcleo arqueado, el núcleo paraventricular, el núcleo lateral, las áreas periforniana y ventromedial. Además, las neuronas orexinérgicas tienen proyecciones

generalizadas a otras áreas del cerebro importantes para la regulación de la alimentación y del despertar, como el locus coeruleus, el núcleo tuberomamilar y el cerebro anterior basal (Hervieu y cols., 2001; Sunter y cols., 2001; Brown y cols., 2002).

Estas neuronas varían de tamaño y de forma, el cuerpo neuronal tiene un diámetro que va de 15-40 µm; pueden ser esféricas, fusiformes o multipolares, y suman alrededor de 3,000 en el cerebro de la rata y hasta 70,000 en el cerebro humano (Nambu y cols., 1999; Peyron y cols., 1998; Figura 8).

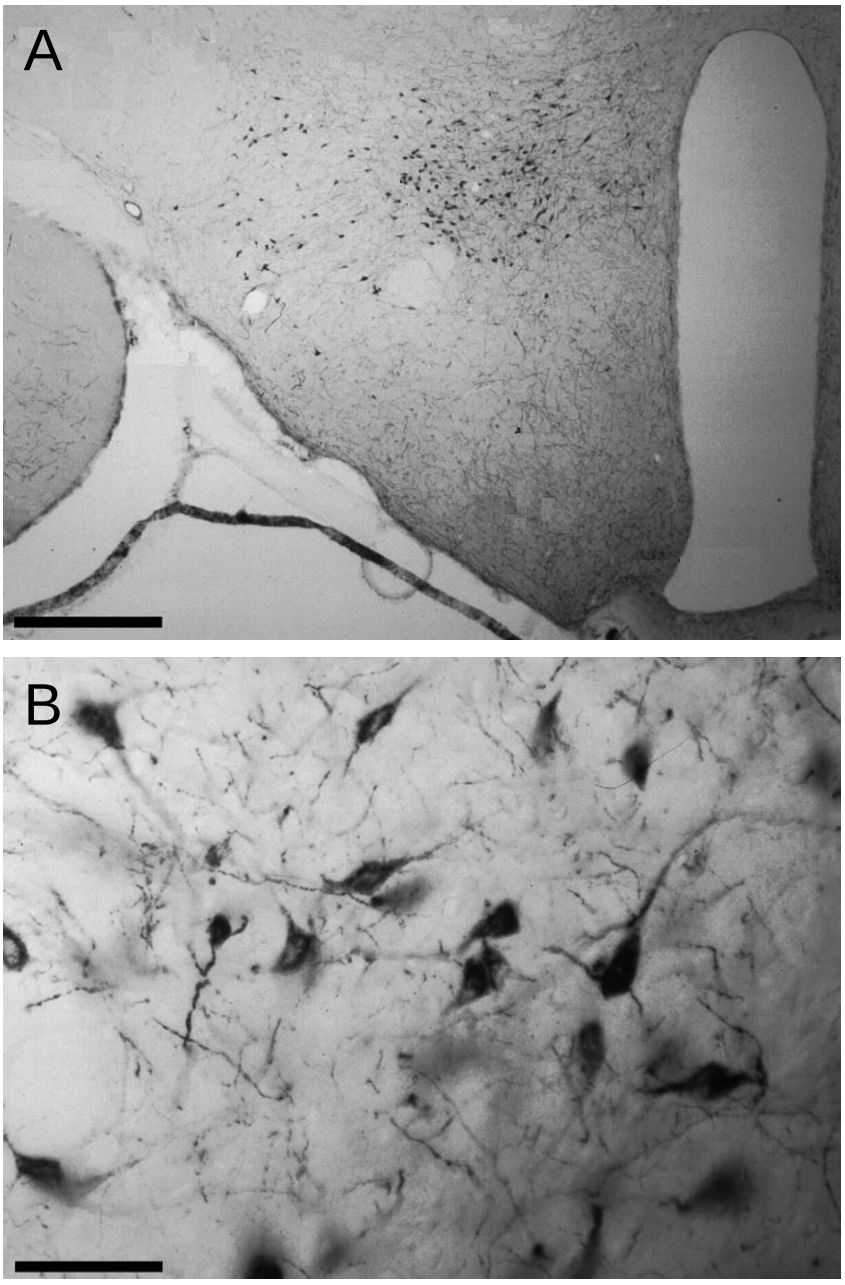

Figura 8. Distribución de cuerpos neuronales de orexina inmunorreactivos (OXR-ir) en cortes coronales de cerebro de rata Wistar. A) Neuronas orexinérgicas teñidas en el hipotálamo. La mayoría de los cuerpos neuronales orexinérgicos se distribuyen alrededor del fórnix, incluido el núcleo perifornical, y el área hipotalámica lateral. **B)** Cuerpos neuronales orexinérgicos a mayor aumento. Cortes coronales = 40 µm. A, barra de calibración = 500 µm; B, barra = 50 µm. Modificado de Nambu y cols., 1999.

Los primeros estudios sugirieron que el sistema orexinérgico era un estimulante central del apetito y la ingesta de alimento, además de participar en la

regulación de los estados de sueño-vigilia (De Lecea y cols., 1998). Hasta ahora, se sabe que el sistema orexinérgico participa en la modulación de múltiples funciones, como en la regulación del ciclo sueño-vigilia, la homeostasis energética, la regulación de la temperatura, la conducta alimentaria, la regulación neuroendocrina y autonómica, la regulación del tono muscular y la locomoción (Schwartz y cols., 2000; Zhang y cols., 2013).

Las orexinas y sus receptores así como su precursor, están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y los órganos periféricos que sugieren las funciones pleiotrópicas de éste neuropéptido; esto se ha descrito en varias especies de vertebrados, principalmente los mamíferos, incluido el hombre (Martyñska y cols., 2006; Figura 9).

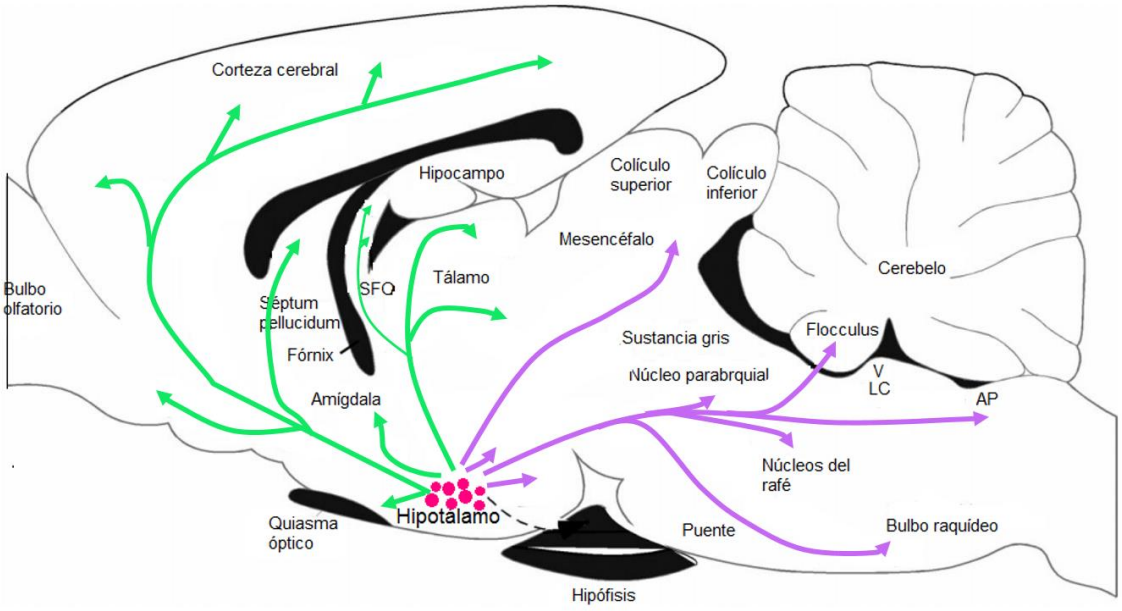

Figura 9. Organización del sistema orexinérgico. Dibujo esquemático de un corte sagital del cerebro de rata que resume la organización del sistema neuronal orexinérgico. Los puntos rosas indican la ubicación relativa de las neuronas inmunorreactivas a orexina y las flechas muestran las principales proyecciones de estas neuronas. SFO: Órgano subfornical, V: Núcleo vestibular, LC: Locus coeruleus, AP: Área postrema. Modificado de Nambu y cols., 1999.

La pérdida selectiva de las neuronas orexinérgicas se asocia con la narcolepsia, aunque en algunos estudios se ha encontrado una pérdida creciente

de células de orexina en pacientes con enfermedades neurodegenerativas con progresión de la enfermedad, como el Parkinson o el Alzheimer sugieriendo que las neuronas orexinérgicas son vulnerables a diferentes procesos neurodegenerativos (Fronczek y cols., 2012; Thannickal y cols., 2007).

3.3.2 Las orexinas y la narcolepsia

La importancia de las orexinas es evidente porque, desde su descubrimiento en 1998, se les relacionó con la regulación del comportamiento alimentario; posteriormente, el hallazgo de que una deficiencia de orexinas es causante de la narcolepsia en humanos y animales (Tsujino y Sakurai, 2013), implicaba que estos neuropéptidos hipotalámicos también tienen un papel crucial en la regulación del sueño y la vigilia (Sakurai, 2005). A partir de estudios experimentales realizados en perros Doberman Pinschers y en labradores con narcolepsia congénita, se ha podido mostrar que las orexinas juegan un rol central en la narcolepsia, ya que estos animales presentan una alteración en el receptor para la orexina B (OX_2R; Lin y cols., 1999), lo cual genera un cuadro de narcolepsia que es similar al descrito en los seres humanos (Nishino y Mignot, 1997).

Con el fin de determinar el rol del sistema orexinérgico, un grupo de investigadores encabezados por el doctor Yanagisawa, generó un ratón carente del gen para la pre-pro-orexina. En él no se observaron alteraciones en la ingesta de alimentos, sin embargo presentaba una somnolencia excesiva y episodios de arresto motor similar a la cataplejía (Chemelli y cols., 1999). Tiempo después, se creó otro grupo de ratones carente del gen para ambos tipos de receptores para las orexinas presentando de manera similar alteraciones en el sueño MOR y episodios de arresto motor como los ratones carentes de la pre-pro-orexina (Willie y cols., 2003); reproduciendo el fenotipo descrito en perros y humanos afectados de narcolepsia-cataplejía. La mutación nula en ratones del OX_1R u OX_2R individualmente mejora sustancialmente el fenotipo de narcolepsia-cataplejía en comparación con los dobles mutantes OX_1R/OX_2R, y resalta las funciones

específicas de los receptores durante el sueño. Los ratones que carecen sólo del receptor OX_1R muestran una leve fragmentación en el ciclo sueño-vigilia; la pérdida de este receptor produce somnolencia, pero no cataplejía con respecto a los ratones que carecen de ambos receptores, OX_1R y OX_2R, que muestran una clara sintomatología similar a la narcolepsia (Willie y cols., 2003; Hoyer y Jacobson, 2013).

Mediante técnicas inmunohistoquímicas ha sido posible determinar que las neuronas orexinérgicas están activas durante el período de oscuridad en roedores, que es el período activo y, por el contrario, mientras duermen, dichas neuronas disminuyen su tasa de disparo (Sakurai, 2007). Por lo que se ha propuesto funciona como un 'interruptor' entre ambos estados (Tabuchi y cols., 2014).

4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

4.1 Modelos experimentales en narcolepsia

El uso de animales como modelos de anatomía y fisiología humana tuvo sus inicios en la antigua Grecia Clásica (Ericsson y cols., 2013). Las considerables similitudes anatómicas y fisiológicas entre humanos y animales, especialmente los mamíferos, han llevado a los investigadores a indagar sobre una gran cantidad de mecanismos y evaluar nuevas terapias en modelos animales para después aplicar dichos descubrimientos en los humanos (Barré-Sinoussi y Montagutelli, 2015). La exploración de las funciones fisiológicas y las interacciones sistémicas requiere de un organismo completo, por lo que es importante hacer uso de los modelos animales.

Como se mencionó anteriormente, desde que se conoció que una deficiencia en el sistema orexinérgico desempeñaba un papel importante en la narcolepsia, se han puesto a disposición diferentes modelos experimentales de narcolepsia, por ejemplo, los ratones genéticamente modificados carentes de un

gen: “*knockout”* para el gen de la pre-pro-orexina o para uno o ambos receptores (Chemelli y cols., 1999), los perros que presentan una mutación en el receptor 2 a orexinas (Nishino y Mignot, 1997; Lin y cols., 1999), la rata que presenta una pérdida de neuronas orexinérgicas por la inyección de la neurotoxina saporina conjugada a orexina B y los roedores transgénicos orexina/ataxina-3 (Hara y cols., 2001). Estos modelos animales has sido empleados en estudios neurofisiológicos, farmacológicos, neuroanatómicos, neuroquímicos y genéticos.

4.1.1 Perros narcolépticos

Los perros narcolépticos presentan episodios de atonía muscular, sueño fragmentado y excesiva somnolencia durante el día, así como una latencia menor al primer episodio de sueño MOR (Kaitin y cols., 1986; Cederberg y cols., 1998). A partir de que se describió la presencia de narcolepsia en perros, se han utilizado para diversos estudios neuroanatómicos, neurofisiológicos, genéticos, farmacológicos y neuroquímicos (Nishino y Mignot, 1997). La enfermedad canina es transmitida por el gen *canarc1* de forma autosómica recesiva con penetrancia completa (Nishino y Mignot, 1997). En 1999, se identificó la mutación del gen causante del fenotipo narcoléptico, dicha mutación está presente en el gen codificador del receptor de la orexina-B, resultando en un receptor no funcional (Lin y cols., 1999). Se ha demostrado, que los perros genéticamente narcolépticos tienen un número normal de neuronas orexinérgicas (Thannickal y cols., 2000).

Los episodios de cataplejía son provocados a través de un estímulo motivacional: la exposición a comida apetitosa como son las albóndigas de carne o al juego; dichos episodios eran evaluados mediante la pruebla estandarizada de cataplejía provocada por exposición a comida (Nishino y Mignot, 1997). Los perros normales, previamente entrenados para comer los trozos de comida en el sentido de las manecillas del reloj, comían los trozos de comida en un tiempo aproximado de 10 segundos, mientras que un perro narcoléptico presentaba varios episodios catapléjicos parciales o completos antes de poder ingerir las albóndigas (Nishino y

Mignot, 1997). La cataplejía también puede ser desencadenada por otras experiencias emocionales positivas como el juego. Las grabaciones poligráficas durante los episodios de cataplejía muestran que los patrones cerebrales se asemejan a los del sueño MOR (Mitler y cols., 1974; Tonokura y cols., 2007).

4.1.2 Ratones carentes de uno o varios genes

Los ratones carentes de un gen, en los que se anula el gen de la pre-pro-orexina, presentan arrestos motores y alteraciones del ciclo sueño-vigilia similares a las que se presentan en el ser humano, además de presentar hipersomnolencia durante la fase oscura, mostrándolos como un buen modelo animal para el estudio de la narcolepsia. Los ratones carentes del gen para orexina presentan períodos de vigilia fragmentados y corta latencia al sueño MOR (Chemelli y cols., 1999). Los ratones que carecen sólo de uno de los receptores, OX_2R, se ven afectados mostrando fragmentación del ciclo sueño-vigilia; la pérdida de este receptor produce somnolencia, pero no cataplejía con respecto a los ratones que carecen de ambos receptores, OX_1R y OX_2R, que muestran una clara sintomatología similar a la narcolepsia-cataplejía. Esto ha ayudado a dilucidar el papel de cada uno de los receptores para orexina.

4.1.3 Modelo de roedores transgénicos orexina/ataxina-3

Otro grupo de investigadores creó un ratón con una degeneración progresiva de las neuronas productoras de orexinas mediante la expresión específica de un producto génico (ataxina-3) con un tramo de poliglutamina expandido que se acumula y es tóxico para las neuronas (Hara y cols., 2001). Estos ratones presentan una neurodegeneración de las neuronas orexinérgicas y un fenotipo de narcolepsia-cataplejía. Este modelo de narcolepsia es más parecido al humano, ya que se desarrolla postnatalmente la pérdida de las neuronas orexinérgicas, y además se pierden funciones de otros neuropéptidos expresados por estas neuronas, como son la galanina o las dinorfinas (Håkansson y cols., 1999; Hara y cols., 2001).

4.1.4 Modelo experimental en ratas

En ratas se ha usado una toxina denominada saporina (SAP; Stirpe y cols., 1983), la cual está conjugada a la orexina B. La inyección de la neurotoxina orexina-B/SAP en el hipotálamo lateral destruye las neuronas orexinérgicas y, por consiguiente, disminuye el contenido de orexina en líquido cefalorraquídeo induciendo un fenotipo narcoléptico (Gerashchenko y cols., 2001). Esta toxina se une al ligando endógeno orexina B e induce una destrucción de aproximadamente el 90% de las neuronas de orexinas, aunque también causa la pérdida de neuronas adyacentes como las que contienen hormona concentradora de melanina (HCM; Gerashchenko y cols., 2003). La destrucción de las neuronas orexinérgicas mediante la orexina-B/SAP induce cambios en el ciclo sueño-vigilia como son alteraciones en los ritmos de la vigilia, del sueño de ondas lentas y del sueño MOR (Ripley y cols., 2001).

4.2 La rata *taiep* como un modelo de narcolepsia-cataplejía

La rata *taiep*, es un mutante de la mielina que se obtuvo de manera espontánea durante el proceso de selección mediante cruzamientos endogámicos para producir una rata con una alta frecuencia de bostezo espontáneo (Holmgren y cols., 1989). Se mantiene en el laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y Control Motor del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

La rata *taiep* muestra una hipomielinización inicial seguida de una desmielinización progresiva del sistema nervioso central debido a una alteración en los oligodendrocitos (Duncan y cols., 1992; Couve y cols., 1997), sin afectar al sistema nervioso periférico; el fenotipo se hereda de manera autosómica recesiva (Holmgren y cols., 1989).

La característica más destacada de los oligodendrocitos en la rata *taiep*, es la acumulación de los microtúbulos unidos a la membrana del retículo endoplásmico, lo que causa una alteración en el transporte de las proteínas que forman las vainas de la mielina en los axones (Couve y cols., 1997; Krsulovic y cols., 1999).

Su nombre es el acrónimo de los signos neurológicos que presenta: temblor, ataxia, inmovilidad, epilepsia y parálisis de las extremidades posteriores (Holmgren y cols., 1989). El síndrome motor es progresivo, de tal forma que aparece al mes de vida con un temblor en los cuartos traseros y la pelvis de 13.3 ± 1.2 Hz, aumentando en la amplitud y disminuyendo en la frecuencia con la edad hasta 5.7 ± 0.6 Hz a los tres meses. La ataxia aparece a los cuatro meses de edad, los episodios de inmovilidad se inician entre los cinco y los seis meses mostrando una máxima susceptibilidad entre los 8.5 y 9.5 meses (Cortés y cols., 2005); dichos episodios pueden presentarse de manera espontánea, o bien, pueden inducirse al sujetar a las ratas repentinamente por la cola.Los episodios de inmovilidad se caracterizan por presentar un registro electroencefalográfico similar al del sueño con movimientos oculares rápidos (MOR), con desincronización cortical y actividad theta en el hipocampo (Cortés y cols., 2005; Eguibar y cols., 2014), mostrándose un decremento del tono muscular seguido de atonía, semejante a la narcolepsia-cataplejía en humanos y en el modelo de narcolepsia canina. Adicionalmente, las ratas *taiep* muestran crisis de ausencia que se caracterizan por la pérdida súbita de la conciencia y una actividad eléctrica cortical anormal que abarca ambos hemisferios del cerebro con una frecuencia de descargas espiga-onda de 2.5 a 4 Hz (Eguibar y Cortés, 2010).

En la rata *taiep*, la administración de sustancias neuroestimulantes como el modafinilo, la cafeína y la dextroanfetamina promueven la vigilia, además de disminuir la frecuencia y duración de los episodios de inmovilidad (Lara, 2011). La administración de agonistas de los receptores α_1 adrenérgicos, como la prazosina aumenta la frecuencia y la duración de los episodios de inmovilidad inducidos al sostener a las ratas *taiep* de la cola (Cortés y cols., 2007). La administración de agonistas de los receptores adrenérgicos α_2 como clonidina y xilacina, aumentan la frecuencia de los episodios de inmovilidad inducidos por sujeción de la cola, mientras que los antagonistas de los receptores α_2 de dichos receptores como la

yohibina y el idazoxan, los disminuyen (Eguibar y cols., 2006). Estos hallazgos se relacionan con los resultados obtenidos en la narcolepsia canina y humana, en los que los receptores adrenérgicos α_2 están involucrados en la modulación de la cataplejía (Nishino y cols., 1990; Wooten, 1994). La administración de (±)-8-Hidroxi-2-(dipropilamino) tetralina bromohidrato (8-OH-DPAT), un agonista del receptor serotoninérgico del subtipo 5-HT_{1A}, y de 3-trifluorometilfenilpiperazina (TFMPP), un agonista del receptor subtipo 5-HT_{1B}, producen una disminución significativa en la frecuencia y duración de los episodios de inmovilidad, lo que demuestra que los receptores serotoninérgicos están también implicados en la suceptibilidad de los episodios de inmovilidad (Ita y cols., 2009).

También se ha estudiado el papel de la dopamina y los receptores dopaminérgicos en los episodios de inmovilidad; la administración de agonistas de los receptores dopaminérgicos D_2 y D_3 como el quinpirole, el hidrobromuro de (±)-7-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina (7-OH-DPAT) y el PD-128,907, aumentaron la frecuencia y la duración de los episodios de inmovilidad (Eguibar y cols., 2010). La administración de antagonistas de los receptores dopaminérgicos como la sulpurida redujeron los episodios de inmovilidad (Eguibar y cols., 2010). Sin embargo la administración de tiaprida y U-99194, antagonistas de los receptores D_2 y D_3 de dopamina, no produjeron cambios significativos ni en la frecuencia, ni en la duración (Eguibar y cols., 2010). En la narcolpesia canina, la administración sistémica de agonistas dopaminérgicos D_2 aumenta la frecuencia de los episodios de cataplejía y la disminuye al administrar sulpirida, un antagonista de los receptores D_2 y D_3 de dopamina (Nishino y Mignot, 1997).

Se ha evaluado la administración de agonistas colinérgicos muscarínicos como la oxotremorina y la pilocarpina, y se mostró que disminuyen la frecuencia de los episodios de inmovilidad inducidos al sostener a los animales de la cola (Cortés, 2011). Todos los resultados de los experimentos mostrados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Caracterización farmacológica de los episodios de inmovilidad en la rata *taiep*

Fármaco	Frecuencia	Duración	Referencia
Modafinilo, cafeína, dextroanfetamina	↓	↓	(Lara, 2011)
Agonistas de los receptores α_1 adrenérgicos (prazosina)	↑	↑	(Cortés y cols., 2007)
Agonistas de los receptores adrenérgicos α_2 (clonidina y xilacina)	↑	↑	(Eguibar y cols., 2006)
Antagonistas de los receptores adrenérgicos α_2 (yohibina e idazoxan)	↓	=	(Eguibar y cols., 2006)
Agonista del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} (8-OH-DPAT y TFMPP)	↓	↓	(Ita y cols., 2009)
Agonistas de los receptores dopaminérgicos D_2 y D_3 (quinpirol, 7-OH-DPAT y PD-128,907)	↑	↑	(Eguibar y cols., 2010)
Antagonistas de los receptores dopaminérgicos D_2 y D_3 (sulpurida)	↓	↓	(Eguibar y cols., 2010)
Agonistas colinérgicos muscarínicos (oxotremorina y pilocarpina)	↓	=	(Cortés, 2011)

↑: aumento; ↓: disminución; =: no hay cambios.

La rata *taiep* tiene un índice de supervivencia hasta los 24 meses de edad, lo que ofrece una ventaja para su estudio (Duncan y cols., 2017; Foote y Blackmore, 2005), lo cual hace a la rata *taiep* un modelo animal óptimo para los estudios del sistema nervioso central con diversos enfoques.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema orexinérgico participa en la modulación de múltiples funciones, como son en la regulación del ciclo sueño-vigilia, la homeostasis energética, la regulación de la temperatura, la conducta alimentaria, la regulación neuroendocrina y autonómica, la regulación del tono muscular y la locomoción (Schwartz y cols., 2000); (Zhang y cols., 2013). Se sabe que la muerte de las neuronas productoras de orexinas ocasiona un fenotipo narcoléptico en humanos, perros y ratones. La narcolepsia es debida principalmente a la muerte de neuronas orexinérgicas del hipotálamo lateral perifornical (Honda y cols., 2009; Nishino y cols., 2010). Existe también un componente genético que la sustenta (Faraco y Mignot, 2011).

Desde que se dio a conocer que una deficiencia en el sistema orexinérgico desempeña un papel importante en la narcolepsia, se han puesto a disposición diferentes modelos experimentales para el estudio de esta hipersomnolencia. La disponibilidad de un modelo genético como la rata *taiep* brinda una oportunidad para estudiar el sistema orexinérgico dado que, los parámetros electroencefalográficos y farmacológicos que presenta, son semejantes a los observados en los pacientes narcolépticos y en la narcolpesia canina, por lo que se ha propuesto a la rata *taiep* como un modelo de esta patología del sueño.

6. HIPÓTESIS

Las ratas *taiep* presentan un menor número de neuronas orexinérgicas en el hipotálamo lateral en comparación con las ratas Sprague-Dawley y éste número de neuronas disminuye progresivamente con la edad.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Realizar un análisis cuantitativo a través de un estudio inmunohistoquímico para la identificación de las neuronas productoras de orexinas en el cerebro de la rata *taiep* macho.

7.2 Objetivos específicos

1. Comparación de la distribución de los cuerpos neuronales inmunorreactivos con orexina en el hipotálamo lateral entre ratas control Sprague-Dawley (SD) y *taiep* macho de 3, 6, 9 y 12 meses de edad.
2. Análisis cuantitativo de neuronas productoras de orexinas en ratas *taiep* macho de 3, 6, 9 y 12 meses de edad.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Animales de experimentación

Se emplearon ratas Sprague-Dawley (SD) y *taiep* macho de 3, 6, 9 y 12 meses de edad mantenidas en condiciones estándar de bioterio con agua purificada (Ciel ™ Coca-Cola Co.) y alimento balanceado para roedores (5008, Purina Mills, Estados Unidos de Norteamérica) *ad libitum*. Con ciclo luz- oscuridad 12:12 (las luces se encienden 0700); temperatura controlada 22 ± 2°C y humedad relativa de 30-45%. Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo la Norma Oficial Mexicana con especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio: NOM-062-ZOO-1999 y siguiendo la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011, NIH por sus siglas en inglés), siendo evaluado y aprobado por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de

Laboratorio (CICUAL) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla: COSM-SAL-17-I.

8.2 Perfusión intracardiaca

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (Sedalpharma, Pet's Pharma) a una dosis de 70 mg/Kg por vía intraperitoneal (i.p.) y perfundidas con paraformaldehído preparado al 4% con buffer de fosfatos salino (PBS; pH 7.2; a una concentración de 0.1 M), ulteriormente, el corazón fue expuesto para insertar en el ventrículo izquierdo una aguja conectada a una bomba peristáltica para la infusión de 250 mL de solución salina (NaCl) al 0.9% seguido de 250 mL de paraformaldehído al 4% a 30 r.p.m. Se realizó una incisión en la aurícula derecha del corazón para el drenaje sanguíneo. Al finalizar la perfusión, se decapitó al animal. Los cerebros perfundidos fueron extraídos y se dejaron fijando en paraformaldehído al 4% por una semana en un refrigerador a 4°C. Después, los cerebros se colocaron en sacarosa concentrada al 30% en PBS a una concentración de 0.1 M y se dejaron a 4°C para criopreservarlos hasta que se obtuvieran los cortes histológicos, cambiando la solución de sacarosa cada 15 días.

8.3 Cortes histológicos cerebrales

Los cerebros fueron montados en platinas y se realizaron cortes coronales de 40 μM de espesor en un criostato (Leica CM1850 – Leica Microsystems) a una distancia de bregma -1.80 mm hasta -4.30 mm siguiendo las coordenadas estereotáxicas del atlas de Paxinos y Watson (2007), en la zona que corresponde al hipotálamo. Se obtuvieron en total de 60 a 70 cortes por cerebro, aproximadamente, siendo colectados en series de cuatro en una matriz de pozos para cultivo celular. Cada corte se colocaba en un pozo diferente, de los cuatro disponibles, llenando con 15 cortes cada pozo en total. Los cortes obtenidos se guardaron en un refrigerador a 4°C hasta su procesamiento.

8.4 Inmunohistoquímica

Se seleccionaron los cortes que correspondían al área hipotalámica lateral, dorsomedial y posterior, regiones de interés en este proyecto. Se eligieron de 15 a 20 cortes por cerebro para realizar la inmunohistoquímica.

Los cortes fueron colocados en PBS a una concentración de 0.1 M más agua oxigenada (H_2O_2); (900 µL diluidos al 30%) para el bloqueo de las peroxidasas por 10 minutos. Se realizaron 2 lavados, de 10 minutos cada uno, con PBS. Se introdujeron los cortes en tubos Eppendorf de 2 mL que contenían 1µL de anticuerpo policlonal de ratón (IgG) contra orexina-A (KK09; diluido 1:1000; sc-80263; Santa Cruz Biotechnology) más 1 mL de SuperMix. Se mantuvieron por 90 minutos en agitación horizontal constante a 40 r.p.m en un agitador (Minitwist nutating mixer, BioProducts SBS500) y se guardaron en el refrigerador a 4°C por 24 hrs. Posteriormente, se realizaron 3 lavados, de 10 minutos cada uno, con PBS. En tubos Eppendorf se colocaron 5 µL de anticuerpo secundario biotinilado (diluido 5:1000; sc-516142; Santa Cruz Biotechnology) más 1 mL de SuperMix y se trasladaron los cortes a dichos tubos, después se incubaron de 90 a 120 minutos en agitación horizontal constante a 40 r.p.m. Se realizaron 3 lavados a los cortes histológicos con PBS por 10 minutos cada lavado. Se colocaron en cada tubo Eppendorf 9 µL de complejo avidina-biotina (ABC; cada reactivo, A y B, fue diluido 9:1000; PK-4000 Vectastain® ABC kit – VectorLabs) más 1 mL de SuperMix. Posteriormente, los cortes fueron colocados en los tubos Eppendorf y se agitaron horizontalmente por 120 minutos. Se efectuaron 3 lavados, de 10 minutos cada uno, con PBS. Se preparó el buffer Trizma pH 7.2 diluyendo 0.77 gr en 50 mL de agua desionizada, agregando una alícuota de diaminobencidina (DAB) para el revelado. Se colocaron los cortes en los cristalizadores que contenían DAB, se mezcló por 30 segundos, posteriormente se agregaron 35 µL de agua oxigenada. El tiempo de espera fue de 15-20 minutos hasta que los cortes se tornaron de un color marrón.

Una vez revelados los cortes y para detener la reacción, se hicieron 3 lavados con PBS, de 10 minutos cada uno.

8.5 Montaje de los cortes cerebrales

Los cortes histológicos cerebrales se colocaron en una placa de Petri que contenía solución de montaje preparada con etanol al 80%, agua desionizada y grenetina para después ser montados en los portaobjetos previamente gelatinizados. Se montaron 6 cortes por cada portaobjetos; los cortes fueron colocados siguiendo la secuencia del eje antero-posterior. Se dejaron los portaobjetos durante 48 horas a temperatura ambiente para su secado.

8.6 Tren de deshidratación de cortes cerebrales

Las sustancias utilizadas se colocaron en cajas coplin de vidrio para sumergir las laminillas en cada una de acuerdo al orden siguiente:

1. Agua desionizada durante 1 minuto.
2. Deshidratación en alcohol al: 70%, 96%, 100%, 2 minutos en cada concentración consecutivamente.
3. Xilol a una concentración del 100% por 2 minutos.

Al finalizar, se retiraron de la solución e inmediatamente se colocó el medio de montaje Entellan® y el cubreobjetos. Las laminillas se dejaron a temperatura ambiente por 48 horas para secarse. Se guardaron en cajas para portaobjetos a temperatura ambiente hasta su ulterior análisis.

8.7 Elección de los cortes cerebrales

Del total de cortes montados por cada cerebro, se eligieron únicamente 4 para el conteo neuronal, tomando en cuenta que se observaran neuronas y que los cortes no fueran continuos, es decir, que tuvieran una separación de por lo menos 30 μM para evitar el conteo neuronal doble, esto con ayuda del atlas estereotáxico Paxinos y Watson (2007).

8.8 Adquisición y procesamiento de imágenes

Los cortes fueron analizados en un microscopio (Axio, Zeiss, Scope.A1) acoplado a una cámara (Axio Cam ICc1) utilizando el objetivo 10x y se tomaron fotografías del área de interés bilateralmente tomando un plano único de cada hemisferio, en el cual se mostrara la mayor cantidad de cuerpos neuronales inmunoteñidos. Las fotografías fueron tomadas y analizadas con el software ZEN lite 2.3 (blue edition) de © Carl Zeiss Microscopy GmBH, 2011.

8.8 Conteo neuronal y análisis histológico

El recuento celular se realizó con el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ versión 1.50i, desarrollado por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos, se realizó el conteo de neuronas productoras de orexina.

8.9 Análisis estadístico

Empleando el programa estadístico SigmaPlot versión 11.0 se graficó la media ± el error estándar de la media del conteo de las neuronas orexinérgicas. Para el análisis del promedio del número total de neuronas orexinérgicas inmunomarcadas entre dos grupos de la misma edad, se llevaron a cabo puebas t de Student. Para el análisis del promedio de neuronas orexinérgicas inmunoteñidas en un mismo grupo a diferentes edades: 3, 6, 9 y 12 meses, se llevaron a cabo pruebas de ANOVA de un factor. Se consideró como diferencia significativa cuando la P fue ≤ 0.05.

9. RESULTADOS

9.1 Comparación del número de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 3 meses de edad

El promedio del número de neuronas orexinérgicas inmunomarcadas en las ratas Sprague-Dawley no tuvo diferencia significativa respecto al promedio de neuronas inmunomarcadas presentes en la rata *taiep*, tal como se observa en la figura 10. El promedio del número de neuronas productoras de orexina en las ratas SD de 3 meses de edad es de 918.25 neuronas y en las ratas *taiep* es de 825 neuronas, sólo un 10.15% mayor respecto al promedio de las ratas *taiep* (prueba t de Student, P=0.597; media ± E.E.M.; n=4).

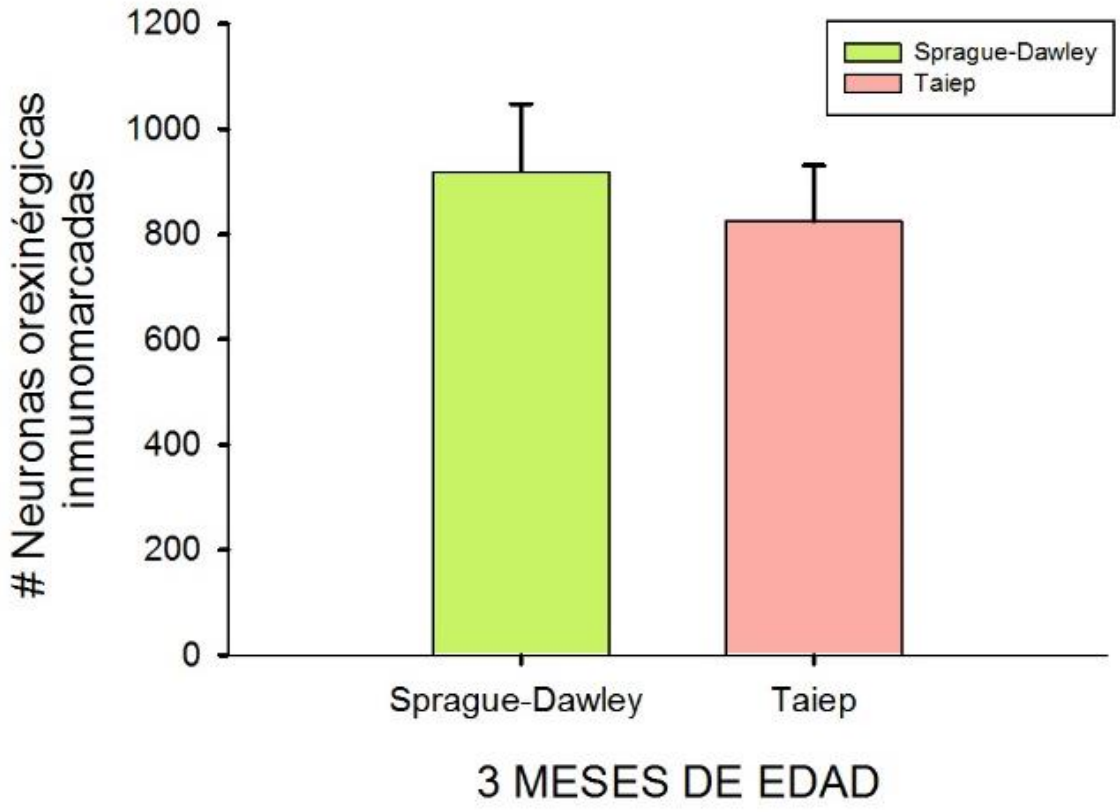

Figura 10. Comparación de la media ± E.E.M. del número de neuronas orexinérgicas inmunomarcadas en ratas Sprague-Dawley y *taiep* de 3 meses de edad. No se obtuvieron diferencias significativas entre los promedios del total de las neuronas orexinérgicas entre las ratas SD y *taiep* de 3 meses de edad (prueba t de Student, P=0.597; media ± E.E.M.; n=4).

9.2 Comparación del número de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 6 meses de edad

No se encontraron diferencias significativas en el promedio del número de neuronas productoras de orexina en las ratas *taiep* de 6 meses de edad. Los promedios fueron de 897.8 en las ratas *taiep*, y 857.8 en las ratas SD. El número de neuronas en las ratas *taiep* es 4.4% mayor respecto al promedio de las ratas SD (Figura 11; prueba t de Student, P= .818; media ± E.E.M.; n=5).

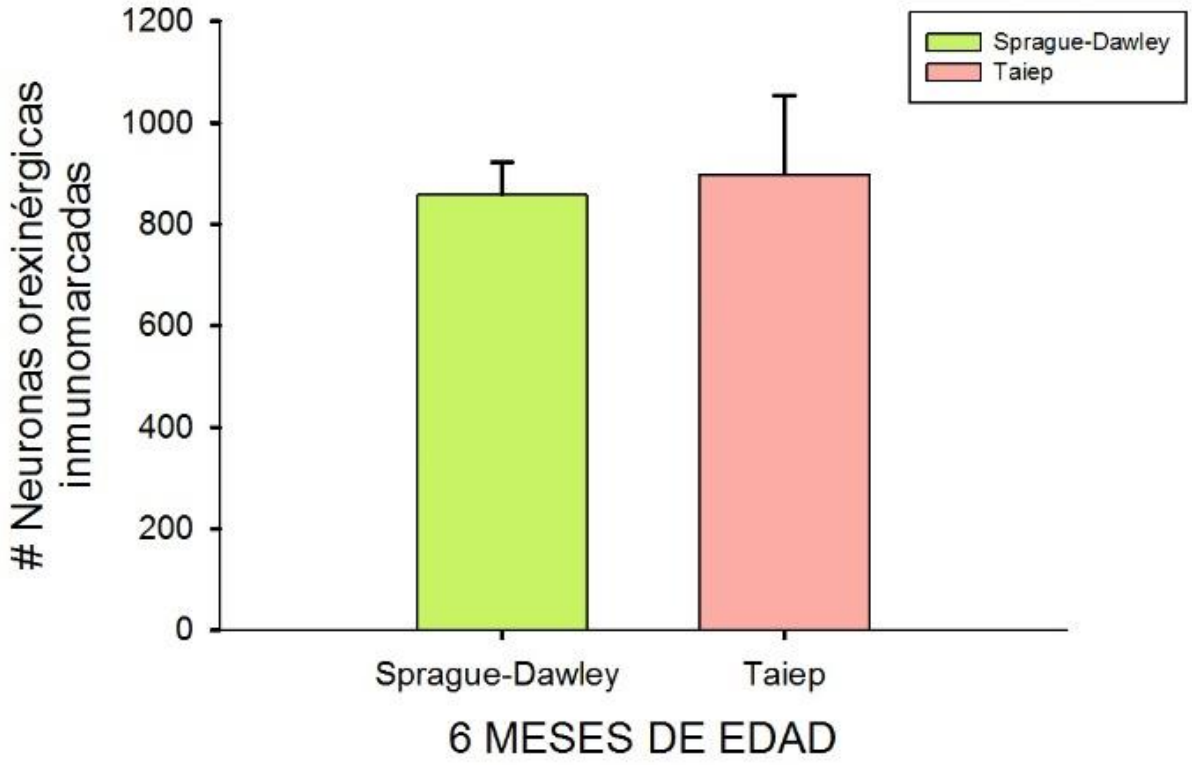

Figura 11. Comparación de la media del número de neuronas orexinérgicas inmunomarcadas en ratas Sprague-Dawley y *taiep* de 6 meses de edad. El promedio de neuronas orexinérgicas en ratas SD es menor con respecto a las ratas *taiep* de 6 meses de edad, sin mostrar diferencias significativas (prueba t de Student, P= .818; media ± E.E.M.; n=5).

9.3 Comparación del número de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 9 meses de edad

El promedio del número de neuronas en ratas SD de 9 meses de edad es de 830.25, y en las *taiep* es de 753.75, el promedio en las SD 9.2% mayor con respecto al promedio de neuronas productoras de orexina en ratas *taiep*, tal como se muestra en la Figura 12 (prueba t de Student, P=.750; media ± E.E.M.; n=4).

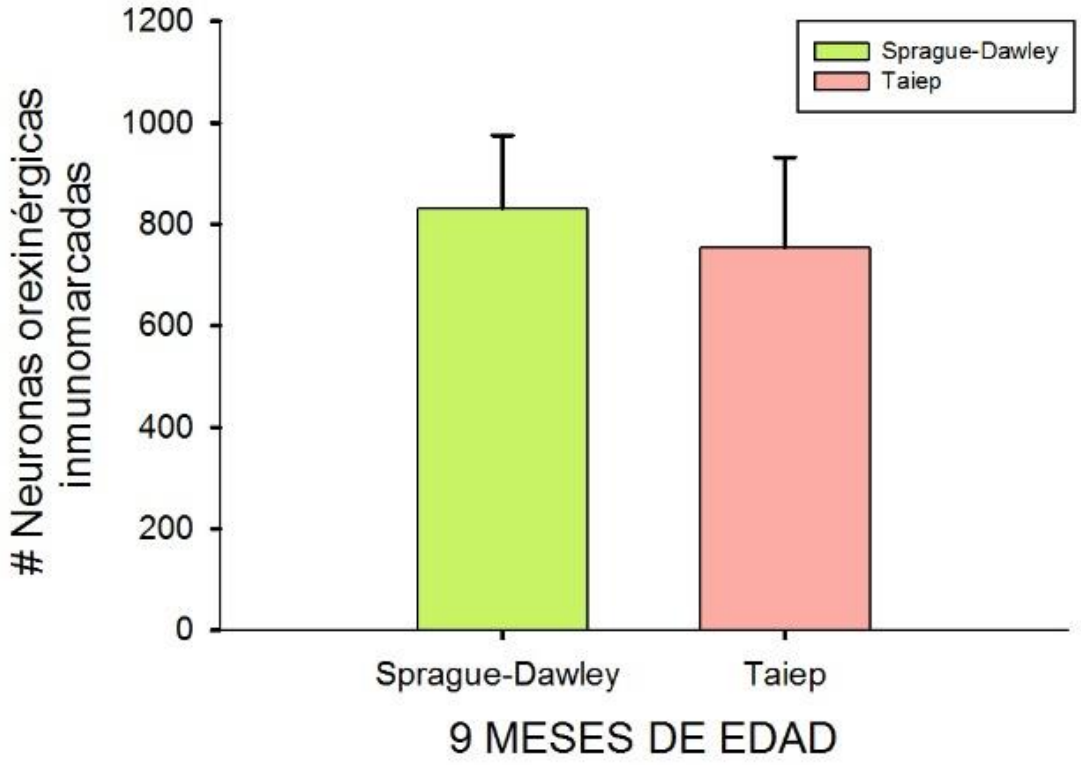

Figura 12. Comparación de la media del número de neuronas orexinérgicas inmunomarcadas en ratas Sprague-Dawley y *taiep* de 9 meses de edad. No se observan diferencias significativas entre la media del número de neuronas orexinérgicas inmunomarcadas de ratas SD respecto a ratas *taiep* de 9 meses de edad (prueba t de Student, P=.750; media ± E.E.M.; n=4).

9.4 Comparación del número de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 12 meses de edad

El promedio del número de neuronas orexinérgicas en ratas *taiep* de 12 meses de edad es de 823.25 y en ratas SD el promedio es de 572.5 neuronas orexinérgicas. Las ratas *taiep* muestran un 30.45% mayor con respecto a la media del número de neuronas productoras de orexina en ratas SD (Figura 13; prueba t de Student, P=.115; media ± E.E.M.; n=4).

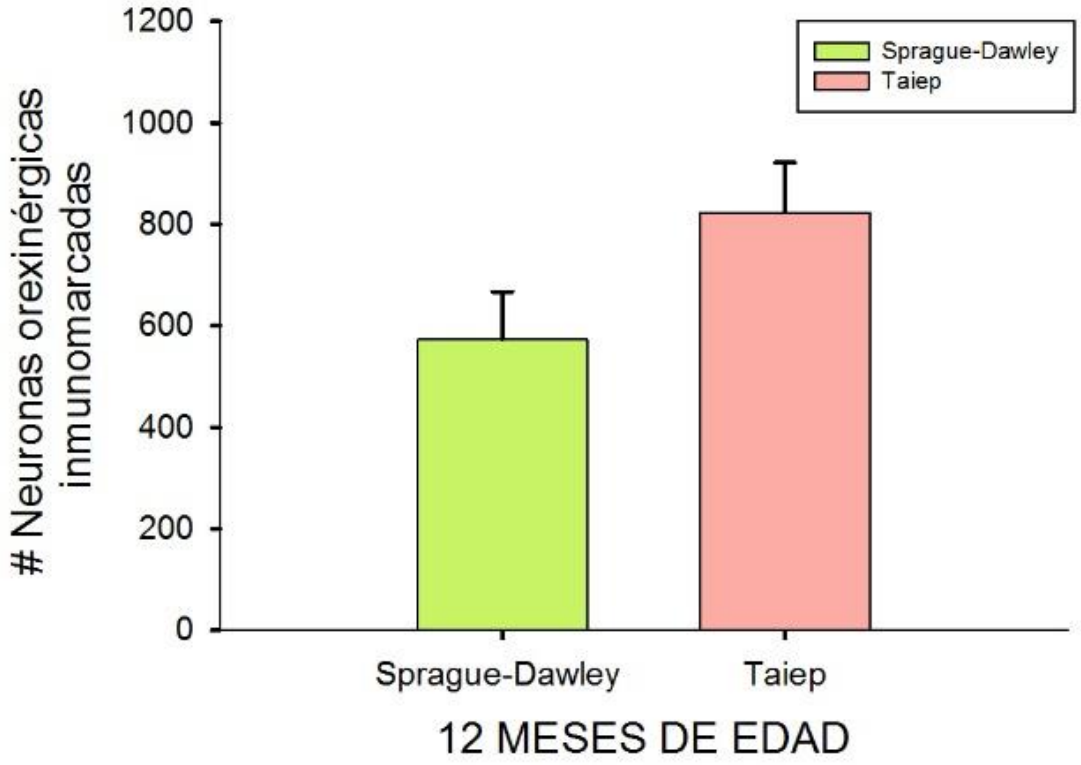

Figura 13. Comparación de la media del número de neuronas orexinérgicas inmunomarcadas en ratas Sprague-Dawley y *taiep* de 12 meses de edad. La media del número de neuronas orexinérgicas de ratas SD es menor con respecto a la media del número de neuronas orexinérgicas presentes en ratas *taiep* de 12 meses de edad (prueba t de Student, P=.115; media ± E.E.M.; n=4).

9.5 Media del número de neuronas orexinérgicas en ratas SD de 3, 6, 9 y 12 meses de edad

Los promedios del número de neuronas productoras de orexina inmunomarcadas en ratas Sprague-Dawley de 3, 6, 9 y 12 meses de edad, no muestran diferencias significativas entre ellos (Figura 14); (ANOVA, F=1.913, P=.177; media ± E.E.M.; n=4, n=5, n=4, n=4, respectivamente).

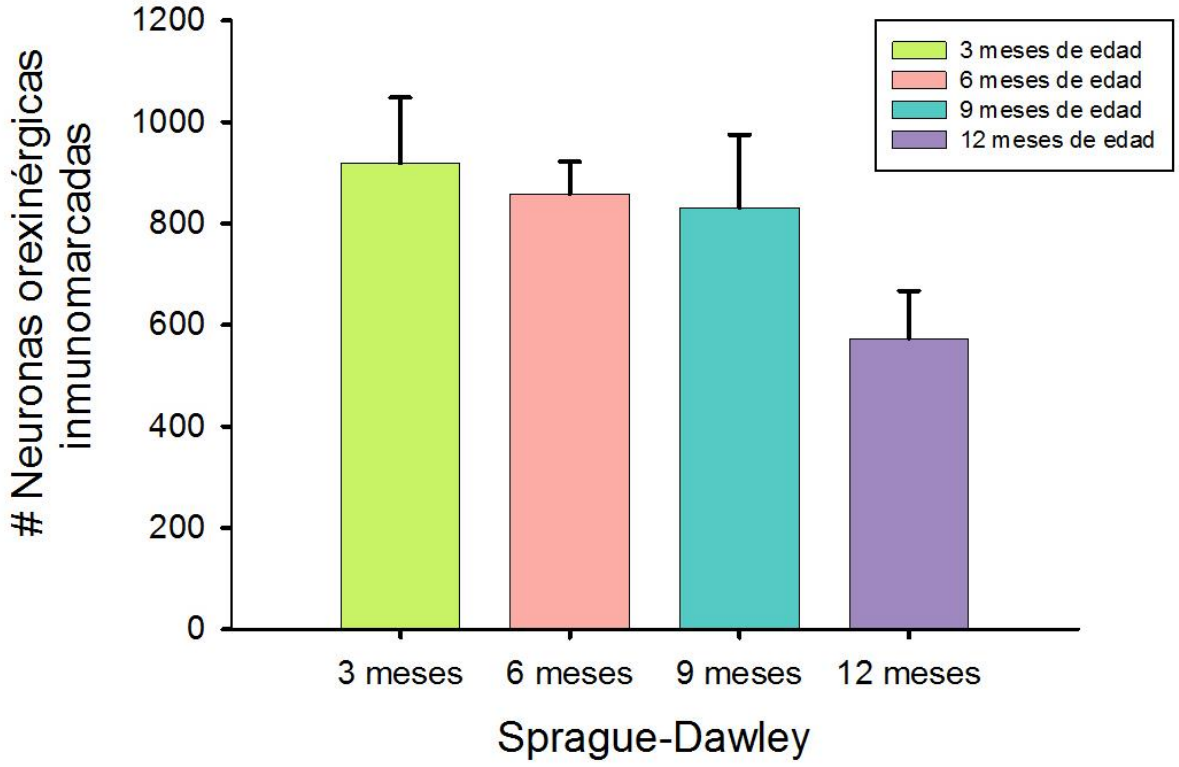

Figura 14. Número de neuronas productoras de orexina en ratas Sprague-Dawley a diferentes edades. El promedio de neuronas orexinérgicas de ratas SD de 3, 6, 9 y 12 meses de edad es de 918.25, 857.8, 830.25 y 572.5, respectivamente. Se observa un decremento en el promedio según incrementa la edad. No se observan diferencias significativas (ANOVA, F=1.913, P=.177; media ± E.E.M.; n=4, n=5, n=4, n=4, respectivamente).

9.6 Media del número de neuronas orexinérgicas en ratas *taiep* de 3, 6, 9 y 12 meses de edad

Los promedios del número de neuronas productoras de orexina inmunomarcadas en ratas *taiep* de 3, 6, 9 y 12 meses de edad, no muestran diferencias significativas entre ellos (Figura 15); (ANOVA, F=.181, P=.907; media ± E.E.M.; n=4, n=5, n=4, n=4, respectivamente).

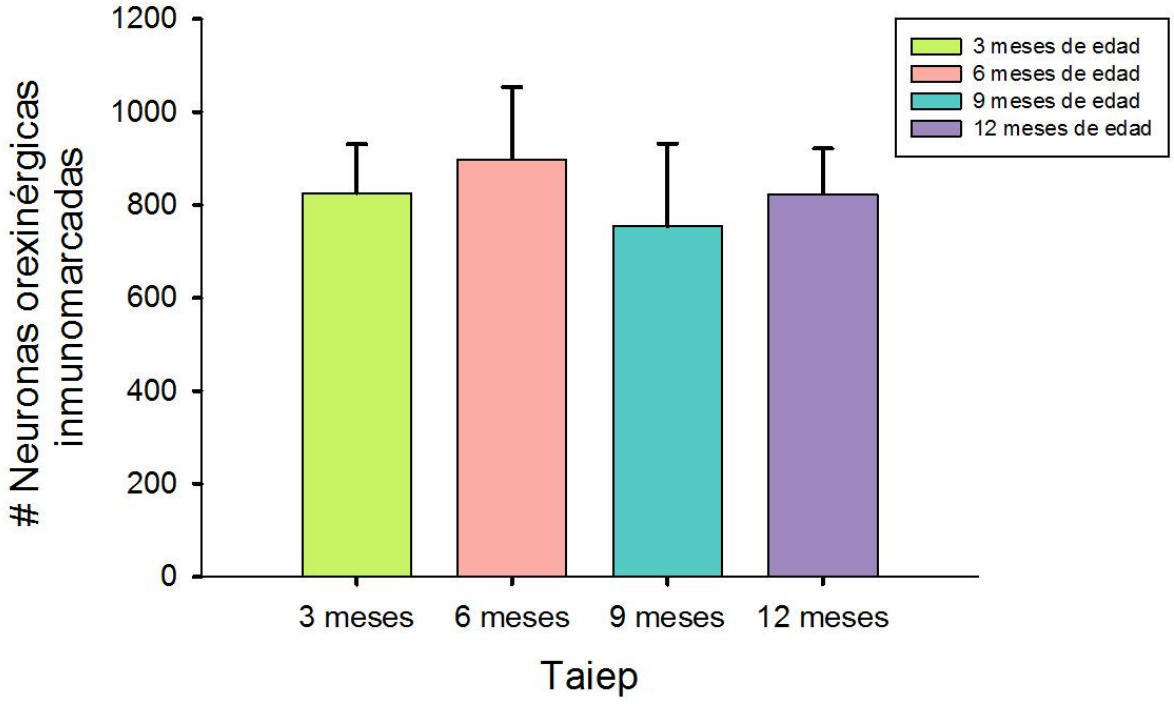

Figura 15. Número de neuronas productoras de orexina en ratas *taiep* a diferentes edades. El promedio de neuronas orexinérgicas de ratas *taiep* de 3, 6, 9 y 12 meses de edad es de 825, 897.8, 753.75 y 823.25, respectivamente. Se observa un aumento en el promedio a los 6 meses de edad, seguido de un decremento a los 9 meses de edad, y un aumento nuevamente a los 12 meses de edad. No se observan diferencias significativas (ANOVA, F=.181, P=.907; media ± E.E.M.; n=4, n=5, n=4, n=4, respectivamente).

9.7 Distribución de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 3 meses de edad

Los cuerpos neuronales orexinérgicos fueron encontrados en el hipotálamo, específicamente en el hipotálamo lateral, dorsomedial y posterior.

La mayoría de los cuerpos neuronales de orexina inmunorreactivos se distribuyeron alrededor del fórnix, incluido el núcleo periforniano. Las neuronas orexinérgicas teñidas también se detectaron a nivel de los núcleos hipotalámicos dorsomedial compacto, dorsal y ventral.

En la Figura 16 se puede apreciar la distribución de los cuerpos neuronales inmunoteñidos para orexina en los cortes cerebrales de ratas SD y *taiep*, respectivamente, de 3 meses de edad. La cantidad de cuerpos neuronales en las ratas SD es 10.15% mayor respecto a la cantidad de neuronas en las ratas *taiep*.

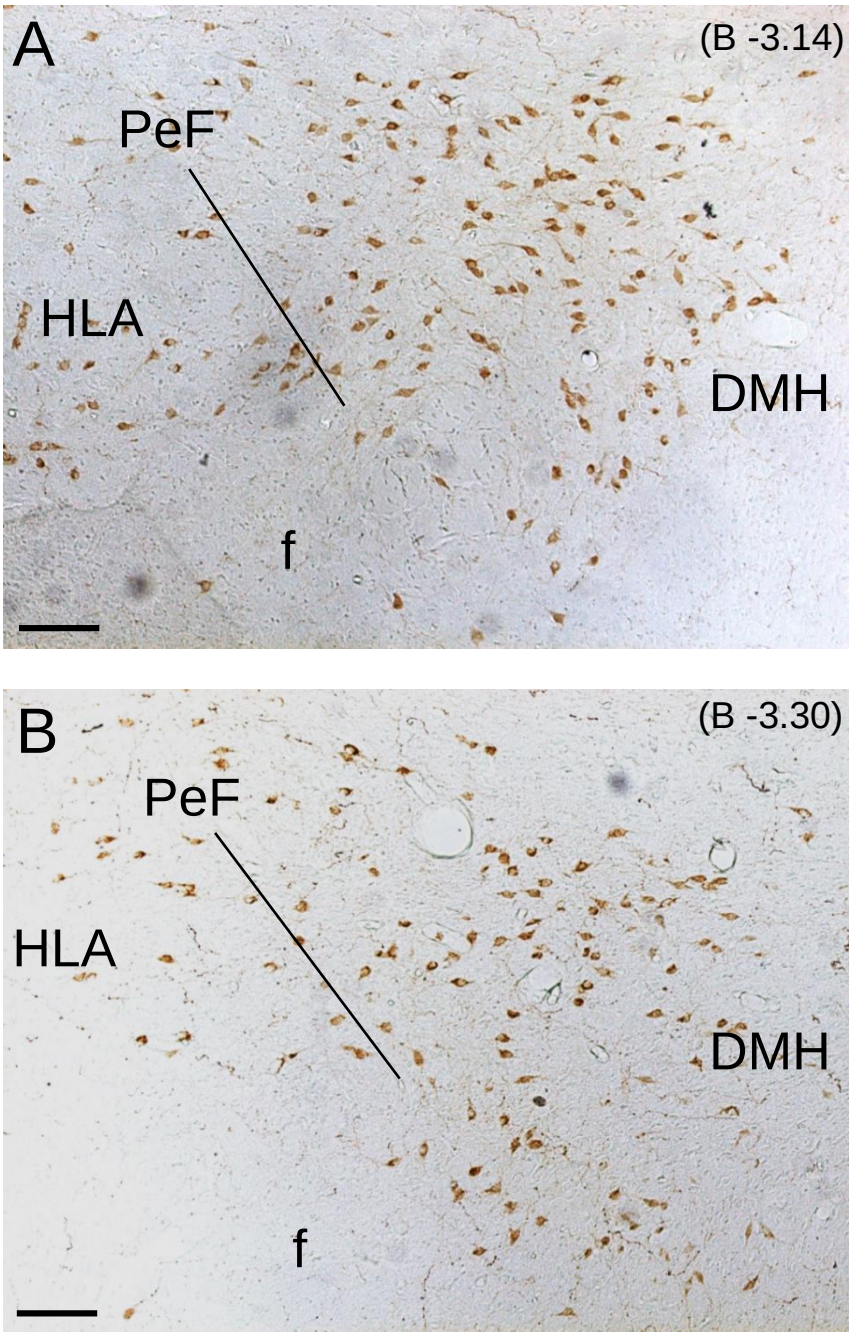

Figura 16. Distribución de cuerpos neuronales de orexina inmunorreactivos (OXR-ir) en cortes coronales de cerebro de rata Sprague-Dawley y *taiep*. A) Corte coronal de una rata SD de 3 meses de edad. **B)** Corte coronal de una rata *taiep* de 3 meses de edad. Los cuerpos neuronales en ambos cortes se distribuyen en el área perifornical, en el núcleo hipotalámico dorsomedial y en el área hipotalámica lateral. El número en la parte superior derecha de cada corte indica la distancia aproximada de bregma con base en el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007). Cortes coronales = 40 µm. Barra de calibrción = 100 µm. Objetivo utilizado: 10x. Abreviaturas: f = fórnix; HLA = área hipotalámica lateral; PeF = núcleo perifornical; DMH = hipotálamo dorsomedial.

9.8 Distribución de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 6 meses de edad

Tal como se muestra en la Figura 17, los cuerpos neuronales orexinérgicos se distribuyeron en el área perifornical, en el hipotálamo lateral y en el núcleo dorsomedial. En las ratas *taiep*, la cantidad de cuerpos neuronales de orexina inmunorreactivos es 4.4% mayor a la cantidad encontrada en ratas SD.

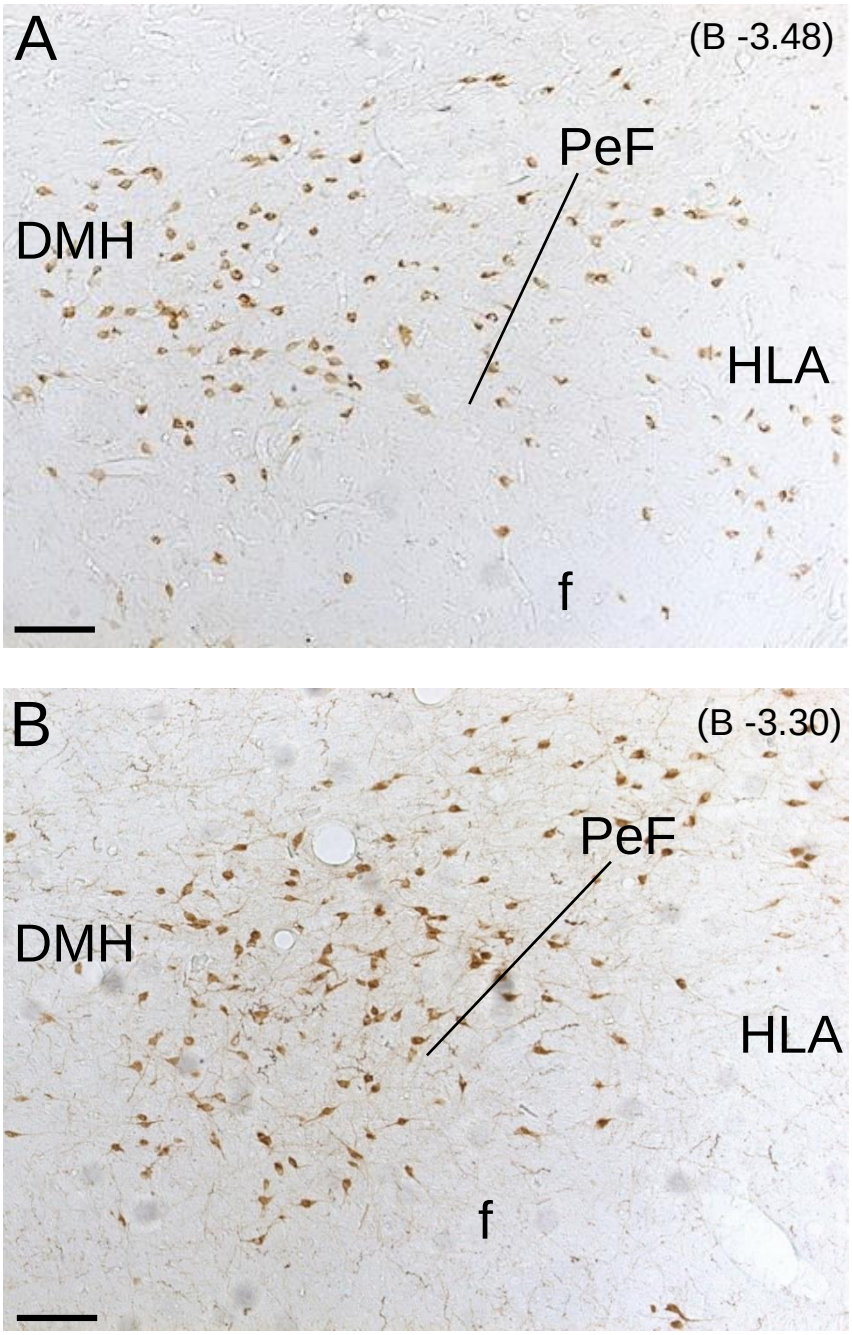

Figura 17. Distribución de cuerpos neuronales de orexina en cortes coronales de cerebro de rata SD y *taiep*. A) Corte coronal de una rata SD de 6 meses de edad. **B)** Corte coronal de una rata *taiep* de 6 meses de edad. Los cuerpos neuronales en ambos cortes se distribuyeron alrededor del fórnix, en en el núcleo hipotalámico dorsomedial, en el área hipotalámica lateral. El número en la parte superior derecha de cada corte indica la distancia aproximada de bregma con base en el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007). Cortes coronales = 40 µm. Barra de calibración = 100 µm. Objetivo utilizado: 10x. Abreviaturas: f = fórnix; HLA = área hipotalámica lateral; PeF = núcleo perifornical; DMH = hipotálamo dorsomedial.

9.9 Distribución de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 9 meses de edad

Las neuronas orexinérgicas inmunoteñidas en las ratas SD y *taiep* de 9 meses de edad también se detectaron a nivel del área perifornical en la parte hipotalámica lateral, en el área perifornical y en el núcleo hipotalámico dorsomedial.

En la Figura 18 se muestra la distribución de los cuerpos neuronales inmunoteñidos con orexina en los cortes cerebrales de ratas SD y *taiep*, respectivamente, de 9 meses de edad. La cantidad de cuerpos neuronales en las ratas SD es 9.2% mayor en comparación a las ratas *taiep*.

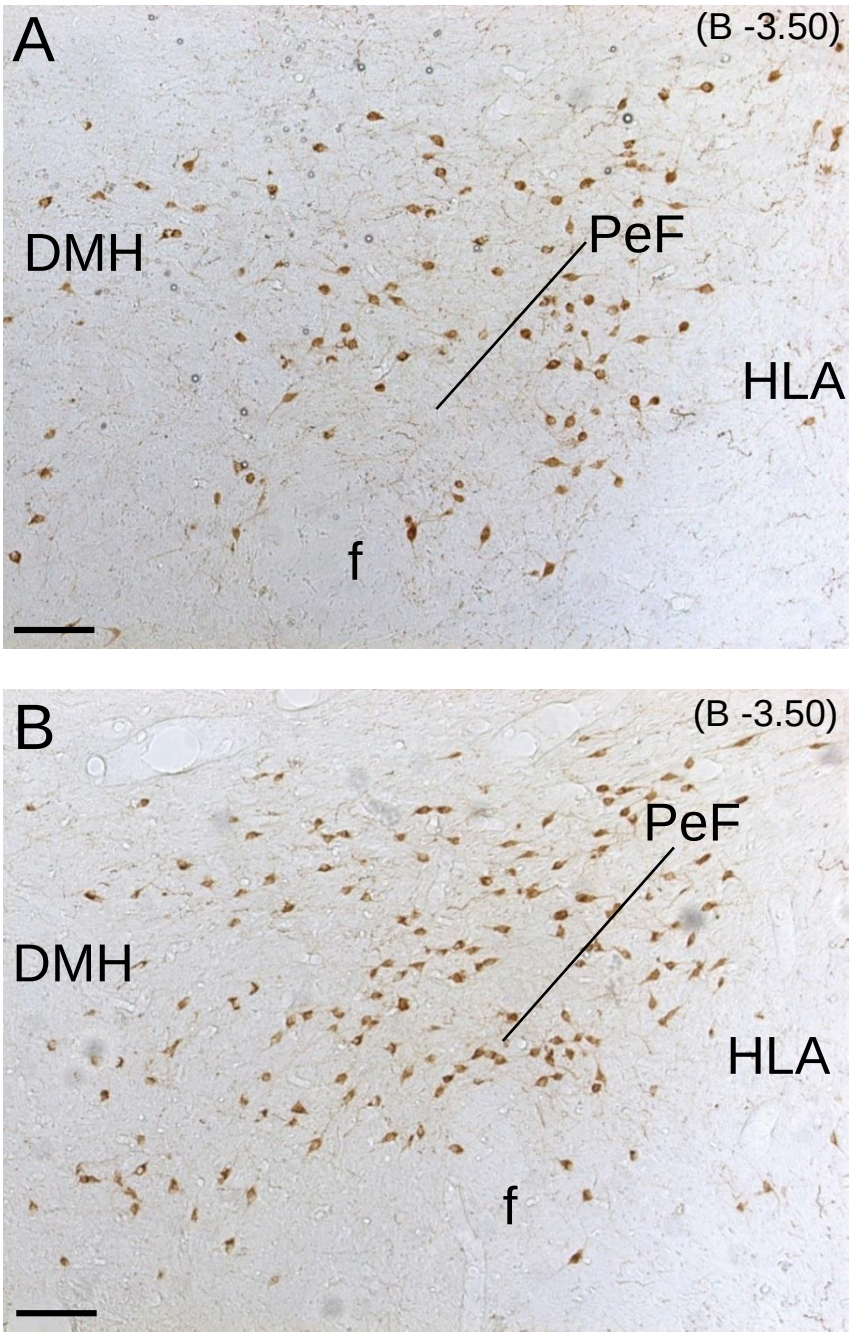

Figura 18. Distribución de cuerpos neuronales de orexina en cortes coronales de cerebro de rata SD y *taiep*. A) Corte coronal de una rata SD de 9 meses de edad. **B)** Corte coronal de una rata *taiep* de 9 meses de edad. Los cuerpos neuronales en ambos cortes se distribuyeron a nivel del área perifornical en la parte hipotalámica lateral, en el área perifornical y en el núcleo hipotalámico dorsomedial. El número en la parte superior derecha de cada corte indica la distancia aproximada de bregma con base en el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007). Cortes coronales = 40 µm. Barra de calibración = 100 µm. Objetivo utilizado: 10x. Abreviaturas: f = fórnix; HLA = área hipotalámica lateral; PeF = núcleo perifornical; DMH = hipotálamo dorsomedial.

9.10 Distribución de neuronas orexinérgicas en ratas SD y *taiep* de 12 meses de edad

Tal como se observa en la Figura 19, los cuerpos neuronales orexinérgicos se distribuyen en el hipotálamo lateral y posterior, específicamente en el núcleo perifornical y en el hipotálamo dorsomedial. La cantidad de cuerpos neuronales en las ratas SD de 12 meses de edad es 30.45% menor en comparación a la cantidad observada en ratas *taiep* de dicha edad.

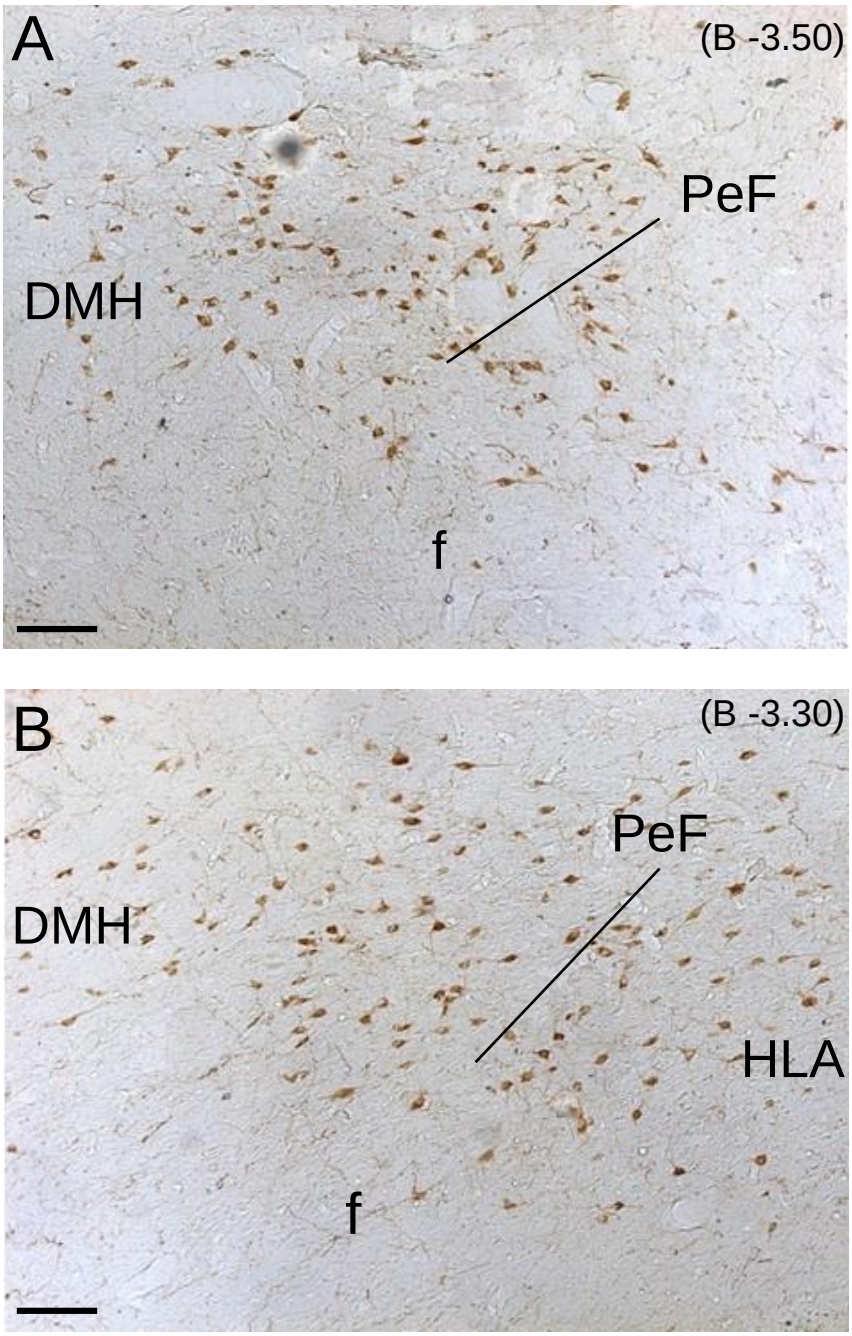

Figura 19. Distribución de cuerpos neuronales de orexina en cortes coronales de cerebro de rata SD y *taiep*. A) Corte coronal de una rata SD de 12 meses de edad. **B)** Corte coronal de una rata *taiep* de 12 meses de edad. Los cuerpos neuronales en ambos cortes se distribuyeron a nivel del área perifornical, en el área hipotalámica lateral y en el núcleo hipotalámico dorsomedial. El número en la parte superior derecha de cada corte indica la distancia aproximada de bregma con base en el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007). Cortes coronales = 40 µm. Barra de calibración = 100 µm. Objetivo utilizado: 10x. Abreviaturas: f = fórnix; HLA = área hipotalámica lateral; PeF = núcleo perifornical; DMH = hipotálamo dorsomedial.

9.11 Distribución de neuronas orexinérgicas en ratas SD de 3, 6, 9 y 12 meses de edad

La distribución de neuronas de orexinas inmunorreactivas no varía entre edades en ratas Sprague-Dawley. Los cuerpos neuronales inmunomarcados no presentan cambios en cuanto a tamaño y forma, como puede ser observado en la Figura 20.

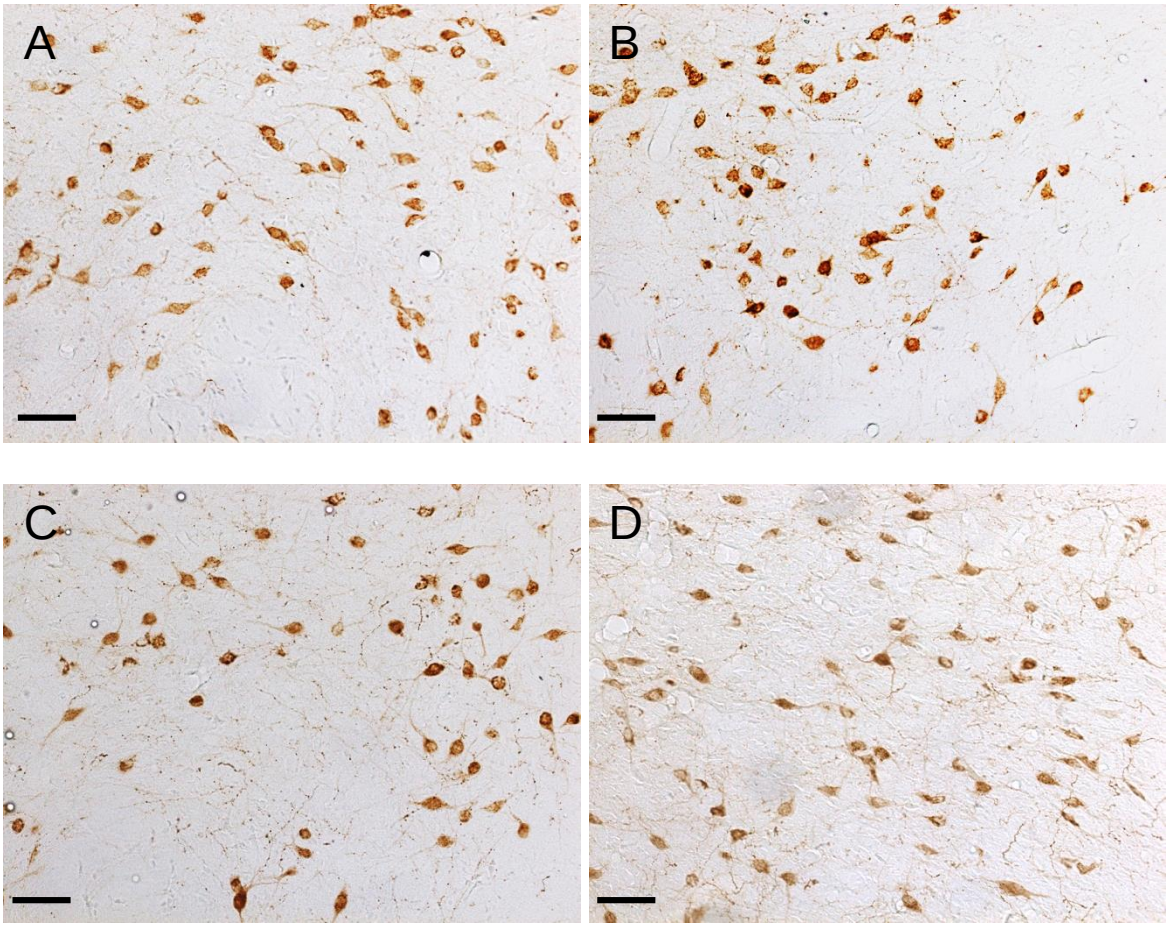

Figura 20. Neuronas orexinérgicas en cortes coronales de cerebros de rata SD a diferentes edades. A) Distribución de cuerpos neuronales en hipotálamo lateral y posterior en un corte coronal de cerebro de rata SD de 3 meses de edad. **B)** Distribución de cuerpos neuronales en hipotálamo lateral y posterior en un corte coronal de cerebro de rata SD de 6 meses de edad. **C)** Distribución de cuerpos neuronales en hipotálamo lateral y posterior en un corte coronal de cerebro de rata SD de 9 meses de edad. **D)** Distribución de cuerpos neuronales en hipotálamo lateral y posterior en un corte coronal de cerebro de rata SD de 12 meses de edad. Barra de calibración = 50 µm. Objetivo utilizado: 20x.

9.11.1 Descripción morfológica de neuronas orexinérgicas en ratas SD

Morfológicamente, las neuronas productoras de orexina en las ratas SD, presentan un soma con un tamaño de entre 15 y 30 µm, fusiforme o circular, y cuentan con 2 o 3 proyecciones dendríticas en promedio. Estas neuronas pueden presentar una orientación horizontal o vertical. No se observan diferencias morfológicas neuronales entre las diferentes edades analizadas.

9.12 Distribución de neuronas orexinérgicas en ratas *taiep* de 3, 6, 9 y 12 meses de edad

La distribución de neuronas de orexinas inmunorreactivas no varía entre edades en ratas *taiep*. Los cuerpos neuronales inmunomarcados no presentan cambios en cuanto a tamaño y forma, como puede ser observado en la Figura 21.

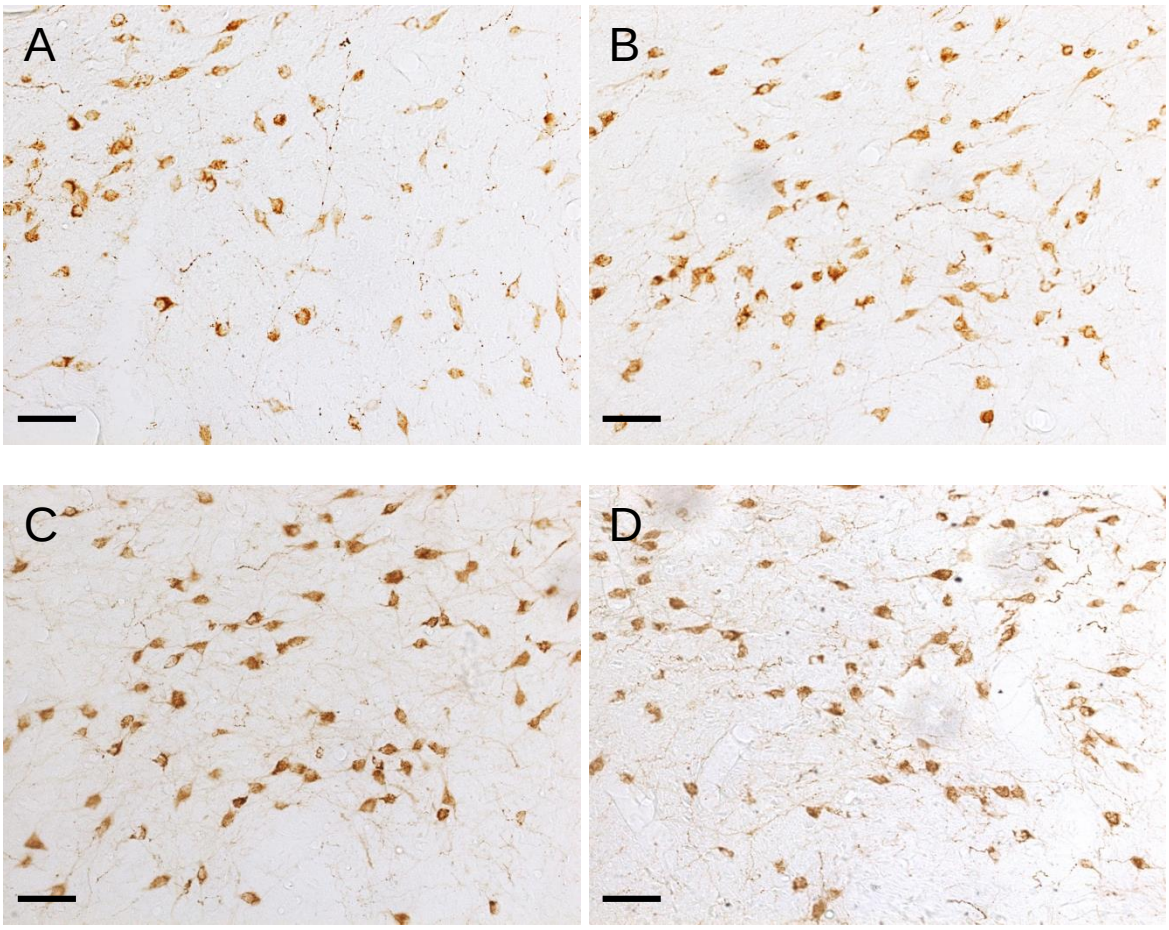

Figura 21. Neuronas orexinérgicas en cortes coronales de cerebros de rata *taiep* a diferentes edades. A) Distribución de cuerpos neuronales en hipotálamo lateral y posterior en un corte coronal de cerebro de rata *taiep* de 3 meses de edad. **B)** Distribución de cuerpos neuronales en hipotálamo lateral y posterior en un corte coronal de cerebro de rata *taiep* de 6 meses de edad. **C)** Distribución de cuerpos neuronales en hipotálamo lateral y posterior en un corte coronal de cerebro de rata *taiep* de 9 meses de edad. **D)** Distribución de cuerpos neuronales en hipotálamo lateral y posterior en un corte coronal de cerebro de rata *taiep* de 12 meses de edad. Barra de calibración = 50 µm. Objetivo utilizado: 20x.

9.12.1 Descripción morfológica de las neuronas orexinérgicas en ratas *taiep*

Morfológicamente, las neuronas de orexina inmunomarcadas en las ratas *taiep*, presentan un soma con un tamaño que va desde las 15 hasta las 30 µm, fusiforme o circular, y cuentan con 2 o 3 proyecciones dendríticas en promedio. Estas neuronas se distribuyen en toda el área del hipotálamo lateral, dorsomedial y

posterior, presentando una orientación horizontal o vertical. No se observan diferencias morfológicas neuronales entre las diferentes edades analizadas.

10. DISCUSIÓN

Los presentes resultados muestran que el número de neuronas orexinérgicas en la rata *taiep* no presenta cambios significativos con respecto a la rata Sprague-Dawley empleada como control. Esto es diferente a lo que sucede en el modelo tratado con saporina o ataxina-3, que induce una destrucción de aproximadamente el 90% de las neuronas orexinérgicas causando también la pérdida de neuronas de MCH (Gerashchenko y cols., 2001). Los datos obtenidos se correlacionan con lo observado en perros narcolépticos de la raza Doberman Pinscher, en los cuales el número de neuronas orexinérgicas no disminuye significativamente (Thannickal y cols., 2000; Ripley y cols., 2001)

La narcolepsia-cataplejía es una enfermedad pleiotrópica; tiene distintas causas las cuales han sido agrupadas en dos tipos con base en los síntomas que se presentan: La narcolepsia tipo 1, en la cual el individuo presenta somnolencia excesiva diurna o episodios de sueño diurno, cataplejía y niveles bajos o ausentes de orexina-A en el líquido cefalorraquídeo (LCR): por debajo de 110 pg/mL; y la narcolepsia tipo 2, en la cual el individuo presenta somnolencia excesiva diurna, latencia corta al sueño MOR, sin embargo, no presenta cataplejía y los niveles de orexina en líquido cefalorraquídeo son normales.

Sin embargo, en los pacientes existen cuadros variados con respecto a la intensidad de la hipersomnolencia, el número de episodios de cataplejía a lo largo del día o de las alucinaciones que caracterizan a la tétrada diagnóstica de la enfermedad.

Así, se ha reportado la narcolpesia en diversos cuadros neurológicos y psiquiátricos como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, el

síndrome de Prader-Willi, enfermedad de Norrie, y el síndrome de Coffin-Lowry, en las cuales algunos pacientes han presentado episodios de cataplejía.

Por otra parte, tras la pandemia de influenza H1N1 durante el invierno 2009-2010, se elaboraron varias vacunas, siendo la denominada 'Pandemrix' con adyuvante AS03 (GlaxoSmithKline Biologicals, Wavre, Bélgica), distribuída principalmente en Europa del Norte, en los países nórdicos, causante de una mayor incidencia de narcolpesia (Verstraeten y cols., 2016). Un grupo importante de pacientes desarrolló un cuadro de narcolepsia tras haber sido vacunados, muchos de ellos adultos jóvenes de entre 21-35 años. De inmediato se analizaron las causas y se determinó que fue el adyuvante el que desencadenó una respuesta inmune cruzada contra las neuronas orexinérgicas y el consecuente desarrollo de narcolepsia (Partinen y cols., 2014; Nellore y Randall, 2016).

La investigación en narcolepsia humana ha llevado a la identificación de alelos HLA específicos (DQB1 * 0602 y DQA1 * 0102) que predisponen al trastorno. Esto es relevante ya que se conoce que ciertos genotipos de los antígenos HLA clase II, con una mayor incidencia por ejemplo en la población japonesa como lo ha reportado el grupo del Dr. Honda y sus colaboradores, se les ha realcionado con la suceptibilidad de la narcolepsia, demostrando que más del 90% de los pacientes presentaban el haplotipo HLA-DQB1 * 0602 y DRB1 * 1501 (Juji y cols., 1984; Miyagawa y cols., 2015).

La destrucción inmunomediada de las neuronas productoras de orexinas puede estar mediada por la microglia, macrófagos que se activan por linfocitos T $CD4^+$ autoantígeno-específico o por superantígenos estimulados por células T $CD8^+$, o por activación de células T independientes mediante la activación de la señalización DQB1 * 0602. La activación de la microglia y los macrófagos puede conducir a la liberación de moléculas neurotóxicas como el ácido quinolínico, que se ha demostrado que causa la destrucción selectiva de las neuronas de orexina en el hipotálamo (Fontana y cols., 2010).

También es probable que intervengan factores genéticos distintos del HLA. En el modelo canino de narcolepsia, el cual ha sido el más estudiado, el trastorno se transmite como un rasgo autosómico recesivo único con penetrancia completa, *canarc-1*, el cual está asociado con una respuesta inflamatoria específica que desencadena este trastorno del sueño.

De hecho, el sistema inmunitario contribuye a los cambios neurodegenerativos y la sintomatología narcoléptica en estos perros, ya que los cerebros de éstos desarrollan activación de la glía, lo que implica un proceso inflamatorio. Cabe la pena destacar que si los perros narcolépticos son tratados con una droga inmunosupresiva como lo es el metotrexato más un antiinflamatorio como la metilprednisolona y azatioprina, se reduce la severidad de los ataques de cataplejía en la edad adulta (Boehmer y cols., 2004), mostrando que la mutación en el receptor tipo 2 a orexinas no es suficiente para el desarrollo completo de la narcolepsia genética canina y que el sistema inmune desempeña un papel importante en el desarrollo de este trastorno, pues se observa una mayor expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II; Tafti y cols., 1996).

La rata *taiep*:

1. Tiene activación de la glía mediada por GFAP, característica común en las enfermedades desmielinizantes (Chávez y cols., 2001).
2. Presenta déficit de quimiocinas como lo son CXCL1, CCR2, CCR5 y el receptor CXCR4, lo que conlleva a la hipomielinización y a la desmielinización (Soto-Rodríguez y cols., 2015).
3. Exhibe infiltración de células de la microglía y macrófagos, además de la presencia de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ (León-Chavez y cols., 2006).
4. Se está en proceso medir todos los leucocitos, linfocitos y sus clonas.

Diversas investigaciones han confirmado la colocalización de péptidos como la dinorfina-A y orexina-A en el hipotálamo lateral, sugiriendo que la dinorfina-A

puede desempeñar un papel importante en la función de las neuronas orexinérgicas (Chou y cols., 2001). La gran mayoría de las neuronas orexinérgicas presenta también inmunorreactividad para el receptor de leptina. Otro neuropéptido que contienen estas neuronas es la galanina (Håkansson y cols., 1999), la cual presenta efectos moduladores en la alimentación. Las neuronas orexinérgicas también contienen y liberan glutamato, el cual se amacena en pequeñas vesículas sinápticas y se libera en zonas activas de las terminales orexinérgicas (Torrealba y cols., 2003).

Por otra parte, estudios recientes han mostrado que la administración sistémica de opioides aumenta la actividad de las neuronas productoras de orexina y que el bloqueo de los receptores para opioides μ disminuye la actividad de dichas neuronas y disminuyen los síntomas narcolépticos en adictos. En modelos animales cuando no hay inmunomarcaje para orexinas, la administración de morfina induce el marcaje de neuronas orexinérgicas (Thannickal y cols., 2018).

Es importante destacar que la administración de [Ala11, DLeu15]-Orexina B, un agonista específico del receptor tipo 2 a orexinas, redujo de manera significativa los episodios de inmovilidad sin afectar el ciclo sueño-vigilia en la rata *taiep* (de Ovando, 2019), lo cual indica que los episodios de inmovilidad están mediados por el OX_2R. Los efectos del receptor tipo 2 están relacionados al ciclo sueño-vigilia, al control del tono muscular y a la actividad locomotora (Samson y cols., 2010; Etori y cols., 2014).

La administración de orexina-A, agonista de ambos receptores, y de orexina-A 17-33, agonista específico del receptor 1 de orexinas, no produjo cambios significativos en el número de episodios de inmovilidad ni cambios en el ciclo sueño-vigilia (de Ovando, 2019).

Cabe destacar que, en los perros narcolépticos, en ausencia del receptor tipo 2 para orexinas funcional, los niveles de orexinas no se ven afectados por fármacos monoaminérgicos y colinérgicos, a pesar de la modulación que tendrían sobre la cataplejía. No existe una correlación entre la severidad de la narcolepsia y los

niveles de orexinas. La reducción de los niveles de orexinas o el bloqueo de la acción de las orexinas no son suficientes para inducir ataques catapléjicos en animales normales (Wu y cols., 2011).

La causa de la somnolencia en la narcolepsia tipo 2, un subtipo de narcolepsia que no está asociado con la cataplejía no está clara, pero puede deberse a una pérdida moderada de neuronas orexinérgicas o una liberación insuficiente de los neuropéptidos orexinérgicos sin reducción detectable en los niveles de orexinas en el líquido cefalorraquídeo (Dalal y cols., 2001; Szabo y cols., 2018).

Dado que la narcolepsia es una enfermedad autoinmune y, considerando que los episodios de inmovilidad muestran un pico entre los 8 y 9 meses de edad y luego decrecen sin cambios en la densidad de orexinas, es necesario determinar el rol de la neuroinflamación en las alteraciones del sueño en la rata *taiep*.

11. CONCLUSIONES

- El número de neuronas orexinérgicas en la rata *taiep* no muestra cambios significativos con respecto a la rata Sprague-Dawley, empleada como control.
- La rata *taiep* es un modelo de narcolepsia tipo 1, con un número normal de neuronas productoras de orexinas en el hipotálamo lateral perifornical y en el hipotálamo posterior.
- La rata *taiep* es un modelo adecuado ya que la desmielinización progresiva permite un análisis sin maniobras adicionales como lo fue en este proyecto donde se cuantificaron los cuerpos de neuronas orexinérgicas.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abhang, P. A., Gawali, B. W., Mehrotra, S. C. (2016). Technological Basics of EEG Recording and Operation of Apparatus. En *Introduction to EEG- and Speech-Based Emotion Recognition*. 1a ed por Abhang, P. A., Gawali, B. W., Mehrotra, S. C. Academic Press, 19–50.

Aldrich, M. S. (1992). Narcolepsy. *Neurology*, **42**: 389-394.

Alvarez, C.E., Sutcliffe, J.G. (2002) Hypocretin is an early member of the incretin gene family. *Neuroscience Letters*, **324**: 169-172.

Andlauer, O., Moore, H., Jouhier, L., Drake, C., Peppard, P. E., Han, F., Haffen, E. (2013). Nocturnal rapid eye movement sleep latency for identifying patients with narcolepsy/hypocretin deficiency. *JAMA Neurology*, **70**: 891-902.

Aston-Jones G., Bloom, F. E. (1981). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *The Journal of Neuroscience*, **1**: 876-886.

Barré-Sinoussi, F., Montagutelli, X. (2015). Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Science*, **1**: 1-3.

Bernard-Valnet, R., Yshii, L., Quériault, C., Nguyen, X. H., Arthaud, S., Rodrigues, M., Canivet, A., Morel, A., Matthys, A., Bauer, J., Pignolet, B., Dauvilliers, Y., Peyron, C., Liblau, R. S. (2016). CD8 T cell-mediated killing of orexinergic neurons induces a narcolepsy-like phenotype in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**: 10956-10961.

Boehmer, L. N., Wu, M. F., John, J., Siegel, J. M. (2004). Treatment with immunosuppressive and anti-inflammatory agents delays onset of canine genetic narcolepsy and reduces symptom severity. *Experimental neurology*, **188**: 292-299.

Brown, R. E., Basheer, R., McKenna, J. T., Strecker, R. E., McCarley, R. W. (2012). Control of sleep and wakefulness. *Physiological Reviews*, **92**: 1087-1187.

Cederberg, R., Nishino, S., Dement, W. C., Mignot, E. (1998). Breeding history of the Stanford colony of narcoleptic dogs. *Veterinary Record*, **142**: 31-36.

Chemelli, R. M., Willie, J. T., Sinton, C. M., Elmquist, J. K., Scamell, 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.

Chokroverty, S. (2010). Overview of sleep & sleep disorders. *The Indian Journal of Medical Research*, **131**: 126-140.

Chokroverty, S. (2011). Cambios fisiológicos durante el sueño. En *Medicina de los trastornos del sueño*. 3a ed por Chokroverty, S. Elsevier España, 80-104.

Chou, T. C., Lee, C. E., Lu, J., Elmquist, J. K., Hara, J., Willie, J. T., Beuckmann, C. T., Chemelli, R. M., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Saper, C. B., Scammell, T. E. (2001). Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin. *Journal of Neuroscience*, **21**: 1-6.

Cortés, M.C. (2011). Estudio electroencefalográfico de los episodios de inmovilidad en la rata *taiep*: papel del sistema colinérgico. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

Cortés, M. C., Arias-Montano, J. A., Eguibar, J. R. (2007). Prazosin increases immobility episodes in taiep rats without changes in the properties of α1 receptors. *Neuroscience Letters*, **412**: 159-162.

Cortés, M. C., Gavito, B., Ita, M. L., Valencia, J., Eguibar, J. R. (2005). Characterization of the spontaneous and gripping-induced immobility episodes on taiep rats. *Synapse*, **58**: 95-101.

Couve, E., Cabello, J. F., Krsulovic, J., Roncagliolo, M. (1997). Binding of microtubules to transitional elements in oligodendrocytes of the myelin mutant *taiep* rat. *Journal of Neuroscience Research*, **47**: 573-581.

Dahlstrom, A., Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system*. Acta Physiologica Scandinavica,* **231**: 1-55.

Dalal, M. A., Schuld, A., Haack, M., Uhr, M., Geisler, P., Eisensehr, I., Noachtar, S., Pollmächer, T. (2001). Normal plasma levels of orexin A (hypocretin-1) in narcoleptic patients. *Neurology*, **56**: 1749-1751.

Darien, I.L., American Academy of Sleep Medicine. (2014). International Classification of Sleep Disorders. *American Academy of Sleep Medicine*, **281**:1387-1394.

Datta, S., Hobson, J. A. (2000). The rat as an experimental model for sleep neurophysiology. *Behavioral Neuroscience*, **114**: 1239-1244.

Da Silva, F. L. (2009). EEG: origin and measurement. En *EEG-fMRI*. 1a ed por Mulert, C., Lemieux, L. Springer, 19-38.

De la Herrán-Arita, A. K., Kornum, B. R., Mahlios, J., Jiang, W., Lin, L., Tiying, H., Macaubas, C., Einen, M., Plazzi, G., Crowe, E., Newell, E. W., Davis, M. M., Mellins, E. D., Mignot, E. (2013). CD4+ T cell autoimmunity to hypocretin/orexin and cross-reactivity to a 2009 H1N1 influenza A epitope in narcolepsy. *Science Translational Medicine*, **5**: 1-13.

De Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron C., Gao, X.-B., Foye, P. E., Danielson, P. E., Fukuhara, C., Battenberg, E. L. F., Gautvik, V. T., Bartlett, F. S., 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 actvity. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**: 322-327.

De Ovando, C. I. (2019). El papel de las orexinas en la regulación del ciclo sueño-vigilia y los episodios de inmovilidad en la rata *taiep*. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas. Instituto de Fisiología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Díaz-Negrillo, A. (2013). Bases bioquímicas implicadas en la regulación del sueño. *Archivos de Neurociencias,* **18**: 42-50.

Dijk, D. J. (2009). Regulation and functional correlates of slow wave sleep. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, **15**: S6–S15.

Diniz Behn, C. G., Kopell, N., Brown, E. N., Mochizuki, T., & Scammell, T. E. (2008). Delayed orexin signaling consolidates wakefulness and sleep: Physiology and modeling. *Journal of Neurophysiology*, **99**: 3090-3103.

Duncan, I.D., Lunn, K. F., Holmgren, B., Urba-Holmgren, R., Brignolo-Holmes, L. (1992). The *taiep* rat: A myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. *Journal of Neurocytology*, **21**: 870-884.

Duncan, I.D., Bugiani, M., Radcliff, A.B., Moran, J.J., Lopez-Anido, C., Duong, P., August, B.K., Wolf, N.I., van der Knaap, M.S., Svaren, J. (2017). A mutation in the Tubb4a gene leads to microtubule accumulation with hypomyelination and demyelination. *Annals Neurology*, **81**: 690-702.

Eguibar, J.R., Cortés, M.C. (2001). La importancia de los modelos animales para el estudio de las enfermedades de la mielina y del sueño. En *Modelos animales para el estudio de enfermedades*. UAM-PUIS (Ed. Javier Velázquez Moctezuma). Temas Selectos de Neurociencias II: 283-303.

Eguibar, J. R., Cortés, M.C. (2010). El mutante de mielina *taiep*. *Gaceta Médica de México*, **146**: 11-18.

Eguibar J.R., Cortés M.C., Lara-Lozano M. (2010). Presynaptic dopaminergic agonists increased gripping-generated immobility episodes in the myelin-mutant *taiep* rat. *Neuroscience Letters*. **483**:189–192.

Eguibar, J. R., Cortés, M. C., Ugarte, A., Leon-Chavez, A. (2014). The myelin mutant rat *taiep* as a model of neuroimmunological disease. *Advances in Neuroimmune Biology*, **5**: 9-17.

Eguibar, J.R., Cortés, M. C., Valencia, J. A., Arias-Montaño. (2006). α_2-Adrenoceptors are involved in the regulation of the gripping-induced immobility episodes in taiep rats. *Synapse*, **60**: 362-370.

Equihua, A. C., De La Herrán-Arita, D., Alberto, K., Drucker-Colin. (2013). Orexin receptor antagonists as therapeutic agents for insomnia. *Frontiers in Pharmacology*, **4**: 1-10.

Ericsson, A. C., Crim, M. J., Franklin, C. L. (2013). A brief history of animal modeling. *Missouri medicine*, **110**: 201-205.

Etori, K., Saito, Y.C., Tsujino, N., Sakurai T. (2014). Effects of a newly developed potent orexin-2 receptor-selective antagonist, compound 1 m, on sleep/wakefulness states in mice. *Frontiers in Neuroscience*. **8**:1-13.

Faraco, J., Mignot, E. (2011). Immunological and genetic aspects of narcolepsy. *Sleep Medicine Research*, **2**: 1-9.

Fahn, S., Chokroverty, S. (2013). Movement Disorders and Sleep: Introduction. En *Sleep and Movement Disorders*. Por Chokroverty, S., Allen, R. P., Walters, A. S., Montagna, P. Oxford University Press (Second Ed). 533-535.

Fontana, A., Gast, H., Reith, W., Recher, M., Birchler, T., Bassetti, C. L. (2010). Narcolepsy: autoimmunity, effector T cell activation due to infection, or T cell independent, major histocompatibility complex class II induced neuronal loss? *Brain*, **133**: 1300-1311.

Foote, A. K., Blakemore, W. F. (2005). Repopulation of oligodendrocyte progenitor cell depleted tissue in a model of chronic demyelination. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **31**: 105-114.

Franco, J., Ballesteros, P., Custodio, V., Paz, C. (2012). Principales neurotransmisores involucrados en la regulación del ciclo sueño-vigilia. *Revista de Investigación Clínica*, **64**: 182-191.

Fronczek, R., van Geest, S., Frölich, M., Overeem, S., Roelandse, F. W., Lammers, G. J., Swaab, D. F. (2012). Hypocretin (orexin) loss in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, **33**: 1642-1650.

Fuller, P. M., Gooley, J. J., Saper, C. B. (2006). Neurobiology of the sleep-wake cycle: Sleep architecture, circadian regulation and regulatory feedback. *Journal of Biological Rhythms*, **6**: 482-493.

García, G., Sánchez, I. G., Martínez G. J., Llanes, A. (2011). Chronobiology: The basics and medical correlates. *Revista Médica del Hospital General de México*, **74**: 108-114.

Gerashchenko, D., Kohls, M. D., Greco, M., Waleh, N. S., Salin-Pascual, R., Kilduff, T. S., Lappi, D.A., Shiromani, P. J. (2001). Hypocretin-2-saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat. *Journal of Neuroscience*, **21**: 7273-7283.

Gerashchenko, D., Blanco-Centurion, C., Greco, M. A., Shiromani, P. J. (2003). Effects of lateral hypothalamic lesion with the neurotoxin hypocretin-2–saporin on sleep in Long–Evans rats. *Neuroscience*, **116**: 223-235.

Green, S. (2011). Disorders of sleep. En *Biological rhythms, sleep and hipnosis*. 1a ed por Green, S. Macmillan International Higher Education. 96-99.

Guilleminault, C. (1994). Narcolepsy. En *Sleep Disorders Medicine*: *Basic Science, Technical Considerations, and Clinical Aspects* 4ª ed por Chokroverty, S. Springer. 241-254.

Guyton. (2011). Estados de actividad cerebral: sueño, ondas cerebrales, epilepsia, psicosis. En *Tratado de Fisiología Médica*. 12a ed. Barcelona: Elsevier España. 721-728.

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

Habbal, O. A., Al-Jabri, A. A. (2009). Circadian rhythm and the immune response: a review. *International reviews of immunology*, **28**: 93-108.

Håkansson, M., Sutcliffe, J. G., Yanagisawa, M., Meister, B. (1999). Leptin receptor- and STAT3-immunoreactivities in hypocretin/orexin neurones of the lateral hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, **11**: 653-663.

Hallmayer, J., Faraco, J., Lin, L., Hesselson, S., Winkelmann, J., Kawashima, M., Mayer, G., Plazzi, G., Nevsimalova, S., Bourgin, P., Hong, S.C., Honda, Y., Honda, M., Högl, B., Longstreth, W.T., Montplaisir, J., Kemlink, D., Einen, M., Chen, J., Musone, S.L., Akana, M., Miyagawa, T., Duan, J., Desautels, A., Erhardt, C., Hesla P.E., Poli, F., Frauscher, B., Jeong, J.H., Lee, S.P., Ton, T.G., Kvale, M., Kolesar, L., Dobrovolná, M., Nepom, G.T., Salomon, D., Wichmann, H.E., Rouleau, G.A., Gieger, C., Levinson, D.F., Gejman, P.V., Meitinger, T., Young, T., Peppard, P., Tokunaga, K., Kwok, P.Y., Risch, N., Mignot, E. (2009). Narcolepsy is strongly associated with the T-cell receptor alpha locus. *Nature Genetics*, **41**: 708-711.

Hara, J., Beuckmann, C., Nambu, T., Willie, J., Chemelli, R., Sinton, C., 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.

Harris, C. D. (2005). Neurophysiology of sleep and wakefulness. *Respiratory Care Clinics of North America*, **11**: 567-586.

Haus, E., Smolensky, M. (2006). Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes & Control*, **17**: 489-500.

Haus, E., Touitou, Y. (1992). Principles of clinical chronobiology. En *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. 1a ed por Touitou, Y y Haus, E. Springer, 6-34.

Hervieu, G. J., Cluderay, J. E., Harrison, D. C., Roberts, J. C., Leslie, R. A. (2001). Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience*, **103**: 777-797.

Hofman, W. F., Talamini, L. M. (2015). Normal sleep and its neurophysiological regulation. En *Modulation of Sleep by Obesity, Diabetes, Age, and Diet.* 1a ed por Ross Watson, R. Academic Press. 25-32.

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. *Laboratory Animal Science*, **39**: 226-228.

Honda, M., Arai, T., Fukazawa, M., Honda, Y., Tsuchiya, K., Salehi, A., Akiyama, H., Mignot, E. (2009). Absence of ubiquitinated inclusions in hypocretin neurons of patients with narcolepsy. *Neurology*, **73**: 511-517.

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**: 1-14.

Honda, Y. (1979). Census of narcolepsy, cataplexy and sleep life among teenagers in Fujisawa city. *Sleep Research*, **8**: 191.

Hoyer, D., Jacobson, L. H. (2013). Orexin in sleep, addiction and more: is the perfect insomnia drug at hand? *Neuropeptides*, **47**: 477-488.

Hublin, C., Partinen, M., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Guilleminault, C. (1994). Epidemiology of narcolepsy. *Sleep*, **17**: S7-S12.

Iber, C. (2005). Sleep-related breathing disorders. *Neurologic Clinics*, **23**: 1045-1057.

Ita, M. L., del Carmen Cortés, M., Valencia, J., Eguibar, J. R. (2009). Activation of serotonin 5-HT_1-receptors decreased gripping-induced immobility episodes in *taiep* rats. *Neuroscience Letters*, **449**: 147-150.

Jouvet, M. (1965). Paradoxical sleep–A Study of Its Nature and Mechanisms. *Progress in Brain Research*, **18**: 20-62.

Juji, T., Satake, M., Honda, Y., & Doi, Y. (1984). HLA antigens in Japanese patients with narcolepsy: all the patients were DR2 positive. *Tissue Antigens*, **24**: 316-319.

Kaitin, K. I., Kilduff, T. S., Dement, W. C. (1986). Evidence for excessive sleepiness in canine narcoleptics. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, **64**: 447-454.

Khan, Z., Trotti, L. M. (2015). Central disorders of hypersomnolence. *Chest*, **148**: 262-273.

Klein, D. C., Moore, R. Y., y Reppert, S. M. (1991). Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock. *USA: Oxford University Press*, 125-143.

Klerman, E. B. (2005). Clinical aspects of human circadian rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, **20**: 375-386.

Krsulovic, J., Couve, E., Roncagliolo, M. (1999). Dysmyelination, demyelination and reactive astrogliosis in the optic nerve of the *taiep* rat. *Biology Reserch*, **32**: 253-262.

Kukkonen, J. P., Leonard, C. S. (2014). Orexin/hypocretin receptor signalling cascades. *British Journal of Pharmacology*, **171**: 314-331.

Langmead, C.J., Jerman, J.C., Brough, S.J., Scott, C., Porter, R.A., Herdon, H.J. (2004). Characterisation of the binding of [3H] SB-674042, a novel nonpeptide antagonist, to the human orexin-1 receptor. *British Journal of Pharmacology*, **141**: 340-346.

Lara M. (2011). Efecto de sustancias promotoras de la vigilia sobre el ciclo sueño-vigilia y en los episodios de inmovilidad en el mutante de la mielina *taiep*. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas. Instituto de Fisiología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

León-Chavez, B. A., Aguilar-Alonso, P., Gonzalez-Barrios, J. A., Eguibar, J. R., Ugarte, A., Brambila, E., Ruiz-Arguelles, A., Martinez-Fong, D. (2006). Increased nitric oxide levels and nitric oxide synthase isoform expression in the cerebellum of the taiep rat during its severe demyelination stage. *Brain Research*, **1121**: 221-230.

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.

Longstreth Jr, W. T., Koepsell, T. D., Ton, T. G., Hendrickson, A. F., Van Belle, G. (2007). The epidemiology of narcolepsy. *Sleep*, **30**: 13-26.

Magoun, H. (1952). An ascending reticular activating system in the brain stem. *American Medical Association Archives of Neurology & Psychiatry*, **67**: 145-154.

Mahowald, M. W., y Schenck, C.H. (2005). Insights from studying human sleep disorders. *Nature*, **437**: 1279-1285.

Malkani, R., Zee, P. C. (2014). Basic Circadian Rhythms and Circadian Sleep Disorders. En Atlas of Sleep Medicine. 2a ed por Chokroverty, S., Thomas, R. J. Elsevier. 119-126.

Manni, R. (2005). Rapid eye movement sleep, non-rapid eye movement sleep, dreams, and hallucinations. *Current Psychiatry Reports*, **7**: 196-200.

Martyñska, L., Polkowska, J., Woliñska-Witort, E., Chmielowska, M., Wasilewska-Dziubiñska, E., Bik, W. (2006). Orexin A and its role in the regulation of the hypothalamo-pituitary axes in the rat. *Reproductive Biology*, **6**: 29-35.

McCarley, R. W. (2007). Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Medicine*, **8**: 302-330.

Mignot, E. (1998). Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology*, **50**: S16-S22.

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 cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Archives of Neurology*, **59**:1553-1562.

Mignot, E., Lin, X., Hesla, P. E., Dement, W. C. (1993). A novel HLA DR17, DQ1 (DQA1-0102/DQB1-0602 positive) haplotype predisposing to narcolepsy in Caucasians. *Sleep: Journal of Sleep Research & Sleep Medicine* **16**: 764-765.

Mignot, E., Lin, X., Arrigoni, J., Macaubas, C., Olive, F., Hallmayer, J., Grumet, F. C. (1994). DQB1* 0602 and DQA1* 0102 (DQ1) are better markers than DR2 for narcolepsy in Caucasian and black Americans. *Sleep*, **17**: S60-S67.

Mitler, M. M., Boysen, B. G., Campbell, L., Dement, W. C. (1974). Narcolepsy-cataplexy in a female dog. *Experimental Neurology,* **45**: 332-340.

Miyagawa, T., Toyoda, H., Kanbayashi, T., Imanishi, A., Sagawa, Y., Kotorii, N., Kotorii, T., Hashizume, Y., Ogi, K., Hiejima, H., Kamei, Y., Hida, A., Miyamoto, M., Ikegami, A., Wada, Y., Takami, M., Fujimura, Y., Tamura, Y., Omata,N., Masuya, Y., Kondo, H., Moriya, S., Furuya, H., Kato, M., Kojima, H., Kashiwase, K., Saji, H., Khor, S., Yamasaki, M., Jun Ishigooka, J., Wada, Y., Chiba, S., Yamada, N., Okawa, M., Kuroda, K., Kume, K., Hirata, K., Uchimura, N., Shimizu, T., Inoue, Y., Honda, Y., Mishima, K., Honda, M., Katsushi, T. (2015). An association analysis of HLA-

DQB1 with narcolepsy without cataplexy and idiopathic hypersomnia with/without long sleep time in a Japanese population. *Human Genome Variation*, **2**: 1-4.

Monti, J. M. (2010). The role of dorsal raphe nucleus serotonergic and non-serotonergic neurons, and of their receptors, in regulating waking and rapid eye movement (REM) sleep. *Sleep Medicine Reviews*, **14**: 319-327.

Moore R. Y. (2007). Suprachiasmatic nucleus in sleep-wake regulation. *Sleep Medicine*, **3**: 27-33.

Moruzzi, G., Magoun, H. W. (1949). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, **1**: 455-473.

Moser, D., Anderer, P., Gruber, G., Parapatics, S., Loretz, E., Boeck, M., Kloesch, G., Heller, E., Schmidt, A., Danker-Hopfe, H., Saletu, B., Zeitlhofer, J., Dorffner, G. (2009). Sleep Classification According to AASM and Rechtschaffen & Kales: Effects on Sleep Scoring Parameters. *Sleep*, **32**: 139-149.

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

Nellore, A., Randall, T. D. (2016). Narcolepsy and influenza vaccination-the inappropriate awakening of immunity. *Annals of Translational Medicine*, **4**: 1-6.

Nishino, S. (2007). Clinical and neurobiological aspects of narcolepsy. *Sleep Medicine*, **8**: 373-399.

Nishino, S., Mignot, E. (1997). Pharmacological aspects of human and canine narcolepsy. *Progress in Neurobiology*, **52**: 27-78.

Nishino, S., Okuro, M., Kotorii, N., Anegawa, E., Ishimaru, Y., Matsumura, M., Kanbayashi, T. (2010). Hypocretin/orexin and narcolepsy: new basic and clinical insights. *Acta Physiologica*, **198**: 209-222.

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

Partinen, M., Kornum, B. R., Plazzi, G., Jennum, P., Julkunen, I., Vaarala, O. (2014). Narcolepsy as an autoimmune disease: the role of H1N1 infection and vaccination. *The Lancet Neurology*, **13**: 600-613.

Pelayo, R., Hodgson, N., Guilleminault, C. (2010). The history of sleep medicine. Handbook of Clinical Neurology, *History of Neurology*, **95**: 547-556.

Peraita-Adrados, R. (2005). Electroencephalography, polysomnography, and other sleep recording systems. En *The physiologic nature of sleep por Parmeggiani*, P. L., Velluti, R. A. Imperial College Press. pp. 103-122.

Perlis, M. L., Giles, D. E., Mendelson, W. B., Bootzin, R. R., Wyatt, J. K. (1997). Psychophysiological insomnia: the behavioural model and a neurocognitive perspective. *Journal of Sleep Research*, **6**: 179-188.

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. *The Journal of Neuroscience*, **18**: 9996-10015.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D. (2001). Physiological Changes in Sleep States. En Neuroscience. 3ª ed por Sunderland (MA): Sinauer Associates. pp. 671-674.

Radulovacki, M., Virus, R.M., Djuricic-Nedelson, M., Green, R. D. (1984). Adenosine analogs and sleep in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **228**: 268-274.

Rama, A. N., Cho, S. C., Kushida, C. A. (2005). NREM–REM sleep. En *Handbook of Clinical Neurophysiology of Sleep Disorders*. 1a ed por Guilleminault, C. Elsevier Vol. 6: 21-29.

Ramesh, V., Thakkar, M., Strecker, R., Basheer, R., McCarley, R. (2004). Wakefulness inducing effects of histamine in the basal forebrain of freely moving rats. *Behavioural Brain Research*, **152**: 271-278.

Ripley, B., Overeem, S., Fujiki, N., Nevsimalova, S., Uchino, M., Yesavage, J., Di Monte, D., Dohi, K., Melberg, A., Lammers, G.J., Nishida, Y., Roelandse, F.W., Hungs, M., Mignot, E., Nishino, S. (2001). CSF hypocretin/orexin levels in narcolepsy and other neurological conditions. *Neurology*, **57**: 2253-2258.

Rivkees, S. A. (2007). The development of circadian rhythms: from animals to humans. *Sleep Medicine Clinics*, **2**: 331-341.

Rodenbeck, A., Binder, R., Geisler, P., Danker-Hopfe, H., Lund, R., Raschke, F., Weeß, H., Schulz, H. (2006). Task Force 'Scoring of Polysomnographic Recordings' of the German Sleep Society (DGSM): A Review of Sleep EEG Patterns. Part I: A Compilation of Amended Rules for Their Visual Recognition according to Rechtschaffen and Kales. *Somnologie*, **10**: 159-175.

Rosenwasser, A. M. (2009). Functional neuroanatomy of sleep and circadian rhythms. *Brain Research Reviews*, **61**: 281-306.

Sakurai, T. (2005). Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Medicine Reviews*, **9**: 231-241.

Sakurai, T. (2007). The neural circuits of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nature Reviews. Neuroscience*, **8**: 171-181.

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.

Samson W.K., Bagley S.L., Ferguson A.V., White M.M. (2010). Orexin receptor subtype activation and locomotor behaviour in the rat. *Acta Physiologica*. **198**:313-324.

Sanford, L. D., Tang, X., Xiao, J., Ross, R. J., Morrison, A. R. (2003). GABAergic regulation of REM sleep in reticularis pontis oralis and caudalis in rats. *Journal of Neurophysiology*, **90**: 938-945.

Saper, C. B. (1987). Diffuse Cortical Projection Systems: Anatomical Organization and Role in Cortical Function, En *Handbook of Physiology: The Nervous System Part 1: Vol 5*. 1a ed por Bethesda, Maryland: American Physiological Society, 169-210.

Saper, C. B., Cano, G., Scammell, T. E. (2005). Homeostatic, Circadian, and Emotional Regulation of Sleep. *The Journal of Comparative Neurology*, **493**: 92-98.

Saper, C.B., Scammell, T.E., Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, **3**: 1257-1263.

Saper, C., Fuller, P., Pedersen, N., Lu, J., Scammell, T. (2010). Sleep state switching. *Neuron*, **68**: 1023-1042.

Sateia, M. J. (2014). International classification of sleep disorders. *Chest*, **146**: 1387-1394.

Schatzberg, A. F., Charles DeBattista, D. M. H. (2019). Hypnotics. En: *Schatzberg's Manual of Clinical Psychopharmacology*. 1a ed por Schatzberg, A. F., Charles DeBattista, D. M. H. American Psychiatric Pub. 475-507.

Schwartz, J. R., Roth, T. (2008). Neurophysiology of sleep and wakefulness: basic science and clinical implications. *Current Neuropharmacology*, **6**: 367-378.

Schwartz, M. D., & Kilduff, T. S. (2015). The neurobiology of sleep and wakefulness. *Psychiatric Clinics*, **38**: 615-644.

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

Sherin, J. E., Elmquist, J. K., Torrealba, F., Saper, C. B. (1998). Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *Journal of Neuroscience*, **18**: 4705-4721.

Shrivastava, D., Jung, S., Saadat, M., Sirohi, R., Crewson, K. (2014). How to interpret the results of a sleep study. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*, **4**: 1-4.

Soto-Rodriguez, G., Gonzalez-Barrios, J. A., Martinez-Fong, D., Blanco-Alvarez, V. M., Eguibar, J. R., Ugarte, A., Martinez-Perez, F., Brambilia, E., Millán-Perez, L., Pazos-Salazar, N., Torres-Soto, M., Garcia-Robles, G., Tomas-Sanchez, C., León-Chávez, B. A. (2015). Analysis of chemokines and receptors expression profile in the myelin mutant taiep rat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **1**: 1-8.

Steriade, M., Datta, S., Pare, D., Oakson, G., Curró R. C. (1990). Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *The Journal of Neuroscience*, **10**: 2541-2559.

Stirpe, F., Gasper-Campani, A., Barbieri, L., Falasca, A., Abbondanza, A., Stevens, W. (1983). Ribosome-inactivating proteins from the seeds of Saponaria officinalis L. (soapwort), of Agrostemma githago L. (corn cockle), and of Asparagus officinalis (asparagus) and from the latex of Hura crepitans L (sandbox tree). *The Biochemical Journal*, **216**: 617-625.

Strecker, R. E., Morairty, S., Thakkar, M. M., Porkka-Heiskanen, T., Basheer, R., Dauphin. L. J., Rainnie, D. G., Portas, C. M., Greene, R. W., McCarley, R. W. (2000). Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behavioural Brain Research*, **115**: 183–204.

Sunter, D., Morgan, I., Edwards, C.M.B., Dakin, C.L., Murphy, K.G., Gardiner, J., Taheri, S., Rayes, E., Bloom, S.R. (2001). Orexins: effects on behavior and

localisation of orexin receptor 2 messenger ribonucleic acid in the rat brainstem. *Brain Research*. **907**: 27–34.

Suntsova, N., Szymusiak, R., Alam, M. N., Guzman-Marin, R., McGinty, D. (2002). Sleep-waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats. *The Journal of Physiology of London*, **543**: 665–677.

Szabo, S. T., Thorpy, M. J., Mayer, G., Peever, J. H., Kilduff, T. S. (2018). Neurobiological and immunogenetic aspects of narcolepsy: Implications for pharmacotherapy. *Sleep Medicine Reviews,* **43**: 23-36.

Szymusiak, R., Alam, N., Steininger, T. L., McGinty, D. (1998). Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Research*, **803**: 178-188.

Szymusiak, R., McGinty, D. (2008). Hypothalamic regulation of sleep and arousal. *Annals of the New York Academy of Science*, **1129**: 275-286.

Tabuchi, S., Tsunematsu, T., Black, S. W., Tominaga, M., Maruyama, M., Takagi, K., Minokoshi, Y., Sakurai, T., Kilduff, T. S., Yamanaka, A. (2014). Conditional ablation of orexin/hypocretin neurons: a new mouse model for the study of narcolepsy and orexin system function. *Journal of Neuroscience*, **34**: 6495-6509.

Tafti, M., Nishino, S., Aldrich, M. S., Liao, W., Dement, W. C., Mignot, E. (1996). Major histocompatibility class II molecules in the CNS: increased microglial expression at the onset of narcolepsy in a canine model. *Journal of Neuroscience*, **16**: 4588-4595.

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

Thannickal, T. C., John, J., Shan, L., Swaab, D. F., Wu, M. F., Ramanathan, L., McGregor, R., Chew, K. T., Cornford, M., Yamanaka, A., Inutsuka, A., Fronckzek, R., Lammers, G. J., Worley, P. F., Siegel, J. M. (2018). Opiates increase the number

of hypocretin-producing cells in human and mouse brain and reverse cataplexy in a mouse model of narcolepsy. Science Translational Medicine, **10**: 1-13.

Thannickal, T. C., Lai, Y. Y., Siegel, J. M. (2007). Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease. *Brain*, **130**: 1586-1595.

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.

Thannickal, T. C., Nienhuis, R., Ramanathan, L., Gulyani, S., Turner, K., Chestnut, B., Siegel, J. M. (2000). Preservation of hypocretin neurons in genetically narcoleptic dogs. *Sleep*, **23** (Suppl 2): A296.

Thannickal, T.C., Nienhuis, R., Siegel, J. M. (2009). Localized loss of hypocretin (orexin) cells in narcolepsy without cataplexy. *Sleep*, **32**: 993-998.

Tonokura, M., Fujita, K., Nishino, S. (2007). Review of pathophysiology and clinical management of narcolepsy in dogs. *Veterinary Record*, **161**: 375-380.

Torrealba, F., Yanagisawa, M., Saper, C. B. (2003). Colocalization of orexin a and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience*, **119**: 1033-1044.

Trachsel, L., Tobler, I., Achermann, P., Borbély, A. A. (1991). Sleep continuity and the REM-nonREM cycle in the rat under baseline conditions and after sleep deprivation. *Physiology & Behavior*, **49**: 575-580.

Trivedi, P., Yu, H., MacNeil, D. J., Van der Ploeg, L. H. T., Guan, X. M. (1998). Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **438**: 71-75.

Tsujino, N., Sakurai, T. (2013). Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, **7**: 1-14.

Urbain, N., Creamer, K., Debonnel, G. (2006). Electrophysiological diversity of the dorsal raphe cells across the sleep-wake cycle of the rat. *The Journal of Physiology of London*, **573**: 679-695.

Vassalli, A., Dijk, D. J. (2009). Sleep function: current questions and new approaches. *European Journal of Neuroscience*, **29**: 1830-1841.

Vazquez, J., Baghdoyan, H. A. (2001). Basal forebrain acetylcholine reléase during REM sleep is significantly greater than during waking. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **280**: R598-R601.

Verstraeten, T., Cohet, C., Dos Santos, G., Ferreira, G. L., Bollaerts, K., Bauchau, V., Shinde, V. (2016). Pandemrix™ and narcolepsy: a critical appraisal of the observational studies. Human Vaccines & Immunotherapeutics, **12**: 187-193.

Vivaldi, E. A., Ocampo, A., Wyneken, U., Roncagliolo, M., Zapata, A. M. (1994). Short-term homeostasis of active sleep and the architecture of sleep in the rat. *Journal of Neurophysiology*, **72**: 1745-1755.

Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T., Hayasaki, H. (2002). GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. En *A Survey of cell biology*. 1ª ed por Jeon, K. W. Academic Press, 1-47.

Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., Kubota, H., Terano, Y., Tohyama, M., Wada, H. (1984). Distribution of histaminergic system in the central nervous system of rats: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Research*, **295**: 13-25.

Williams, J., Roth, A., Vatthauer, K., McCrae, C. S. (2013). Cognitive behavioral treatment of insomnia. *Chest*, **143**: 554-565.

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 síndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron*, **38**: 715-730.

Wooten, V. (1994). Effectiveness of yohimbine in treating narcolpesy. *Southern Medical Journal*, **87**: 1065-1066.

World Health Organization. (1992). Nonorganic sleep disorders. En *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines*. Ed Geneva: World Health Organization, 142-149.

Wu, M. F., Nienhuis, R., Maidment, N., Lam, H. A., Siegel, J. M. (2011). Role of the hypocretin (orexin) receptor 2 (Hcrt-r2) in the regulation of hypocretin level and cataplexy. *Journal of Neuroscience*, **31**: 6305-6310.

Xie, Z., Chen, F., Li, W., Geng, X., Li, C., Meng, X., Feng, Y., Liu, W., Yu, F. (2017). A review of sleep disorders and melatonin. *Neurological Research*, **39**: 559-565.

Zhang, X. Y., Yu, L., Zhuang, Q. X., Zhu, J.N., Wang, J.J. (2013). Central functions of the orexinergic system. *Neuroscience Bulletin*, **29**: 355-365.