

## AS ATUAIS CONTRIBUIÇÕES DO MODELO ANIMAL DA NARCOLEPSIA: O CAMUNDONGO KNOCKOUT E O ZEBRAFISH

**Clara Odilia Inocente<sup>1</sup>, Janine Julieta Inocente<sup>2</sup>, Nancy Julieta Inocente<sup>3</sup>, Rubens Reimão<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Université Claude Bernard Lyon 1/Doutorado em Neurociências e Cognição, 99 Cours de la Marne 33800 Bordeaux (França), vetclara@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Université Victor Segalen Bordeaux 2/Doutorado em Psicologia da Saúde, 99 Cours de la Marne 33800 Bordeaux (França), janineinocente@yahoo.fr

<sup>3</sup>Departamento, Endereço, nancyinocente@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Departamento de Neurologia, Endereço, reimaorubensneuro@yahoo.com

**Resumo-** A narcolepsia é uma doença neurológica, classificada como um distúrbio do sono e acometer o homem, o peixe zebra e diversas espécies animais, como a felina, canina, eqüina, bovina, roedora e no peixe zebra. O estudo é do tipo descritivo, realizado a partir de um levantamento bibliográfico-científico, o critério estabelecido foi analisar a contribuição do modelo animal nos avanços fisiopatológicos, no tratamento e na genética da narcolepsia humana. Os mecanismos neurobiológicos, fisiopatológicos e a farmacoterapia da narcolepsia são estão totalmente esclarecidos. Esses modelos animais são importantes na compreensão e nos avanços científicos desta doença.

**Palavras-chave:** Modelo animal, narcolepsia, sono, zebrafish, camundongo knockout.

**Área do Conhecimento:** Ciências sociais aplicadas.

### Introdução

A narcolepsia é uma doença neurológica, classificada como um distúrbio do sono por apresentar principalmente sintomas de sonolência excessiva diurna, seguido de cataplexia e alterações no sono REM. A cataplexia é a atonia muscular brusca provocada por intensas emoções. Considerada como uma hipersonia, este distúrbio do sono, além de acometer o homem, pode manifestar-se nas espécies felina, canina, eqüina, bovina, roedora e no peixe zebra (*Danio rerio*). Nota-se certa predisposição nas raças caninas como o poodle, beagle, doberman, dachshund e labrador. Nos eqüinos, foram observados casos de narcolepsia especialmente no poney.

A fisiopatologia da narcolepsia é baseada nos sistemas de hipocretina. A hipocretina é um neuropeptídeo produzido pelos neurônios hipotalâmicos laterais, posteriores e perifornicais, que se expandem por todo o cérebro, monitorando: a homeostase de energia, secreção de hormônios da alimentação e o controle neuro-endócrino, função circadiana e regulação sono-vigília. Graça a contribuição dos modelos animais da narcolepsia, concluiu-se que a neurotransmissão deficiente de hipocretina é a base fisiopatológica desta hipersonia, na qual são incluídos diferentes mecanismos: a degeneração dos neurônios em ratos; a deficiência de hipocretina em humanos, cães e ratos; e a deficiência do receptor de hipocretina nos cães e ratos. Os mecanismos

neurobiológicos, fisiopatológicos e a farmacoterapia da narcolepsia são estão totalmente esclarecidos. Esses modelos animais são importantes na compreensão e nos avanços científicos desta doença.

### Metodologia

O estudo é do tipo descritivo. Realizado a partir de um levantamento bibliográfico-científico, o critério estabelecido foi analisar a contribuição do modelo animal nos avanços fisiopatológicos, no tratamento e na genética da narcolepsia humana. Foram analisados artigos científicos internacionais consultados através das bases de dados Pubmed, nos anos de 2006 a 2010. O uso das palavras-chave inclui a associação dos seguintes termos em inglês: "mouse knock-out", "zebrafish", "narcolepsy", "animal model", "physiopathology", "genetic" e "therapy".

### Resultados

#### ***O modelo do zebrafish com narcolepsia***

A distribuição da hipocretina (HCRT) no cérebro do peixe zebra mostra-se semelhante à observada em mamíferos. O modelo do peixe zebra narcoléptico, mutante de receptores de HCRT, mostrou um leve aumento global da atividade e episódios curtos de sono noturno, quando comparados aos peixes zebras normais, e

um aumento do sono diurno, que é um dos principais sintomas da narcolepsia. O efeito da luz sobre o sono do peixe zebra, comentado anteriormente, evitou o importante aumento da sonolência diurna, que é notadamente encontrada nos mamíferos narcolépticos (Jones, 2007). A injeção intracerebral de hipocretina no peixe zebra controle provocou o sono, diferente do peixe zebra mutante que não apresentou nenhum efeito. Portanto, a hipocretina parece promover o sono no peixe zebra, o que o difere dos mamíferos, e que pode ser explicada por uma distribuição diferencial de hipocretina e seus receptores no cérebro do peixe zebra. Outra diferença notável entre os mamíferos foi a ausência de projeções de neurônios produtores de HCRT para os neurônios monoaminérgicos, que, no caso do peixe zebra, estes neurônios projetam-se nos neurônios inibitórios GABA, o que sugere a importância desses neurônios para a modulação do sono do peixe zebra (Jones, 2007). Uma hipótese é formada para explicar essas diferenças no papel da hipocretina: ela pode ter dupla função em mamíferos (promove o sono durante a noite e a vigília durante o dia) e justificaria a insônia noturna e a sonolência diurna excessiva, como sintomas da narcolepsia. Portanto, o peixe zebra poderia compartilhar com os mamíferos a promoção do circuito neuronal do sono, mas não o circuito da vigília.

Yokogawa et al. (2007) promoveram a mutação do peixe zebra pela interrupção do sistema de hipocretinas e curiosamente, esses peixes não apresentaram sonolência excessiva ou paralisia do sono, mas também tiveram redução de 30% do sono noturno e 60% de decréscimo no sono total quando comparados com os peixes não-mutantes. Os pesquisadores estudaram o sistema de hipocretinas e outros sistemas, e encontraram diferenças da expressão cerebral dos peixes zebras, que pode explicar as diferenças de comportamento. Outro estudo realizado por Appelbaum et al. (2007) analisou, através da hibridização in situ, a expressão de receptores e enzimas que regulam a transmissão mediada por ATP em células produtoras de hipocretina no peixe zebra. A transcrição do DNA ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 3 (ENTPD3/NTPDase3, em inglês) foi expressa em células HCRT, como acontece nos mamíferos, os nervos cranianos (gV, gVII, gIV e gX) e em neurônios sensoriais primários da medula espinhal. A expressão do gene p2rx (principalmente o gene p2rx2, p2rx3.1, perx3.2 e p2rx8) do peixe zebra (família próxima aos receptores purinérgicos) apresentou-se em sobreposição ao padrão de expressão do gene entpd3, em contraste com os mamíferos onde o gene p2rx2 não foi expresso nas células HCRT. O

gene p2rx8 e entpd3 foram expressos na região do hipotálamo nos mamíferos. Os autores concluíram que a expressão desses genes em células HCRT e nos neurônios sensoriais em vertebrados sugere um papel importante para a transmissão de regulação do sono e na transformação de entradas sensoriais mediadas por ATP.

### ***A contribuição do camundongo knockout na narcolepsia***

#### *A narcolepsia e a obesidade*

Zhang et al. (2006), analisou a relação entre o sistema-hipocretina, o metabolismo e o sono pela medição da locomoção, da alimentação, da temperatura corporal, do sono-vigília, e do metabolismo de energia no modelo de camundongos narcolépticos pela ablação dos neurônios à hipocretina. Nos camundongos narcolépticos, a fragmentação de sono-vigília é a causa principal causa da redução significativa da locomoção, alimentação e despesa de energia, quando comparados com os ratos-controles. Para esses autores, o sistema de hipocretinas pode não ser o responsável pelo ganho energético em função da regulação do sono-vigília, da locomoção ou da alimentação.

Em uma pesquisa realizada por Fujiki et al. (2006) relacionada a hipocretina e a obesidade usando dois tipos de camundongos knockout (KO) e o modelo narcoléptico transgênico deficiente de hipocretina/ataxin-3 (TG), encontraram que os ratos narcolépticos de KO e de TG com fundos genéticos misturados (N4-5, composição 93.75-96.88% genética de C57BL/6) tenderam a ser mais pesado do que os camundongos-selvagens de 100-200 dias. O peso de corpo dos camundongos heterozigotos era intermediário entre aqueles de camundongos de KO e dos camundongos selvagens. A obesidade era mais proeminente nas fêmeas em camundongos narcolépticos KO e de TG e foi associado com os níveis mais elevados de leptina no soro, sugerindo uma resistência parcial da leptina. A obesidade é menos proeminente nos camundongos TG, e mais evidente nas fêmeas. O estudo confirmou que a deficiência de hipocretina é um dos fatores críticos para a tendência a obesidade em narcolepsia. Entretanto, os fatores múltiplos e a diferença do sexo em sinalizar a leptina-hipocretina podem estar envolvidos<sup>2</sup>.

A deficiência de hipocretina e as suas conseqüências pré-dispõem a obesidade e o ganho de peso nos ratos narcolépticos.

#### *Transmissão colinérgica e cataplexia*

Os estudos farmacológicos sobre a narcolepsia canina indicam que a transmissão exagerada colinérgica na região da ponte cerebral promove a cataplexia. A ausência de sinalização da hipocretina é um defeito primário na narcolepsia com cataplexia.

Kalogiannis et al. (2010) investigaram se os marcadores de transmissão sináptica colinérgica podem ser alterados em camundongos sem receptores de hipocretina orexina. O RNA mensageiro para a colina acetiltransferase, o transportador vesicular de acetilcolina e do transportador de colina de alta afinidade, exceto o acetilcolinesterase, foram significativamente maiores nos camundongos narcolépticos do que no tipo selvagem, nas regiões do núcleo tegmental laterodorsal e do núcleo motor, não incluindo o tronco cerebral inteiro. Os pesquisadores usaram a técnica de imunocitoquímica para colina acetiltransferase e verificou-se que o número de neurônios colinérgicos no núcleo tegmental laterodorsal e no núcleo motor não foram diferentes. A intensidade da imunocoloração somática da colina acetiltransferase foi significativamente maior no núcleo tegmental laterodorsal em camundongos narcolépticos. A atividade da colina acetiltransferase foi reduzida na região cortical em camundongos com narcolepsia, em comparação com camundongos selvagens. Segundo os autores, a hipocretina pode regular a expressão de neurotransmissores e a ausência da sinalização de hipocretina resulta no aumento da neurotransmissão colinérgica e da população neuronal na região mesopontina. Este efeito tem sido associado ao sono REM e a cataplexia.

#### *Dinâmica do sono-vigília e hipocretina*

A narcolepsia com cataplexia é causado por uma perda da sinalização de hipocretina, porém os mecanismos fisiológicos que resultam na deficiência da manutenção da vigília e a fragmentação do sono permanecem desconhecidos. A hipocretina é um neuropeptídeo expresso pelos neurônios localizados na área lateral do hipotálamo, estão envolvidos na regulação do sono/vigília. A sua deficiência resulta em fenótipo de roedores, cães e seres humanos narcolépticos, sugerindo que a hipocretina são importantes para a consolidação da vigília. No entanto, o efeito fisiológico de transmissão aumentada de hipocretina, pode ser importante para a compreensão dos efeitos de agonistas de hipocretina, que são candidatos a agentes terapêuticos de narcolepsia, até o momento não caracterizado.

Diniz Behn et al. (2010) desenvolveram uma técnica de análise espectral pelo eletroencefalograma (EEG) para determinar se a instabilidade do sono-vigília, no modelo do camundongo selvagem e Knockout (KO) deficiente de hipocretina e com narcolepsia, reflete na vigília ou no sono, através da transição anormal ou mais rápida entre esses dois estágios. Os pesquisadores analisaram os registros encefalográficos usando uma técnica de análise da duração entre os estágios e a transição do sono-vigília de forma quantitativa e imparcial.

Os camundongos KO apresentaram mudanças rápidas entre os estágios do sono não-REM 2 e 3 (caracterizado pelas ondas cerebrais do tipo delta) e 4 (caracterizado pela onda teta), predominando, nos registros, o tempo mais dedicado as zonas de transições dos estágios do sono não-REM. Esta análise permite a visualização dos limites entre o sono e a vigília e mostra que os camundongos narcolépticos apresentam estados menos distintos e mais instáveis do sono e da vigília.

Segundo Willie et al. (2010) os camundongos transgênicos que apresentam super-expressão de um gene de hipocretina conduzido por um promotor beta-actina citomegalovirus híbrido apresentam anomalias no ciclo sono-vigília. Esses pesquisadores também observaram alterações do sono com fragmentação dos movimentos oculares não-rápidos e redução do sono REM. O sono não-REM apresentou-se perturbado por episódios curtos de vigília. Esses modelos animais apresentaram atonia muscular incompleta durante o sono REM com atividades mioelétricas anormais. Estes resultados sugerem que a atividade da hipocretina deve ser regulamentada para a manutenção normal dos estados do sono. A transmissão de hipocretina deve ser ativada durante a vigília e inativada ou reduzida durante o sono.

Mäkelä et al. (2010) analisaram os efeitos da hipocretina sobre os padrões de sono-vigília em camundongos transgênicos com superexpressão do gene humano prepro-hipocretina sob o controle do promotor endógeno. A superexpressão de hipocretina foi investigada por PCR, Southern e Western blotting e imunohistoquímica. Os registros polissonográficos foram realizados para análise dos padrões de sono-vigília e para a atividade eletroencefalográfica de base, durante 24 h, durante e após 6 h de privação de sono. Os camundongos transgênicos tiveram aumento da expressão de prepro-hipocretina e hipocretina-1, no hipotálamo. Houve uma diminuição endógena na expressão do transgene dos receptores de hipocretina-2, sem afetar os receptores de hipocretina no

proscéfalos basal, córtex e hipocampo. Os camundongos transgênicos mostraram diferenças significativas em relação a vigília e sono não-REM, especialmente durante os períodos de transição claro-escuro, e uma ligeira redução do sono REM durante o início e o período de recuperação após a privação do sono. Os ratos transgênicos apresentam uma pequena redução no sono REM, além de diferenças quantitativas de vigília na transição dos períodos claro/escuro. Em geral, os padrões de sono de camundongos transgênicos não diferenciaram significativamente do tipo selvagens.

#### *A relação entre a histamina e a hipocretina*

Anaclet et al. (2010), investigaram a função dos neurônios de hipocretina e histamina, respectivamente, na manutenção da vigília e no comportamento e no sono-vigília em camundongos knockout com fenótipos deficientes de hipocretina e de histamina. Embora ambas as linhagens de camundongos exibissem o sono fragmentado e aumento do sono REM, estes animais apresentaram diferenças marcantes:

- aumento de sono REM em camundongos deficientes de histamina observados durante o período diurno e os camundongos deficientes de hipocretina durante o período noturno;
- os camundongos deficientes de hipocretina não tinham deficiência na vigília na ausência de luz, apresentaram um EEG normal e responderam comportamentalmente bem a um novo ambiente.
- apenas os camundongos deficientes de hipocretina exibiram narcolepsia e deficiência na vigília quando confrontado com o desafio do motor. Perante o mesmo desafio, os camundongos selvagens voluntariamente gastaram mais tempo nesta tarefa e apresentaram-se muito despertos acompanhados por uma densa expressão da proteína c-fos em muitas áreas do cérebro, incluindo os neurônios de hipocretina do hipotálamo dorsolateral.

A vigília e a deficiência motora dos camundongos deficientes de hipocretina foram devido à falta de hipocretina. Na administração intraventricular de hipocretina-A, notou-se a restauração na quantidade de vigília e no desempenho motor. A administração de SB-334867 (antagonista do receptor hipocretina1) reduziu a vigília e a locomoção de camundongos selvagens. Esses pesquisadores acreditam que a hipocretina promove a vigília através da atividade locomotora e sugere que os neurônios de histamina e de orexina exercem funções distintas, mas complementares e sinérgicas no controle da vigília. O neuropeptídeo pode estar envolvido em

seus aspectos comportamentais, ao passo que a amina é o principal responsável para os aspectos quantitativos cognitivos e da ativação cortical.

#### *Patogênese da narcolepsia e o ácido quinolínico*

A estimulação excessiva de N-metil-D-aspartato (NMDA, um aminoácido excitatório agonista do neurotransmissor-aminoácido, o glutamato) pelo ácido quinolínico causou a perda de neurônios de hipocretina em ratos. Obukuro et al. (2010) examinaram a toxicidade dessa excitotoxina em neurônios à hipocretina e neurônios à melanina (MCH) in vivo. A administração de 60 e 120 nmol do ácido quinolínico no hipotálamo lateral causou a perda seletiva de neurônios à melatonina, ao invés de neurônios à hipocretina. Essa toxicidade foi atenuada pelo MK-801 (um receptor antagonista do NMDA e a perda seletiva de neurônios à melanina e neurônios à orexina foi preservada mesmo quando antagonistas do receptor GABA (bicuculina picrotoxina) foram injetados. A diminuição significativa no número de neurônios hipocretina foi induzida quando a injeção de ácido quinolínico foi realizada na fase escura do ciclo diurno, mas o grau de redução foi ainda menor no número de neurônios à melanina. Os resultados não sustentam a hipótese de que a excitotoxicidade aguda mediada por receptores NMDA e a causa da patogênese da narcolepsia.

#### *Teoria auto-imune da narcolepsia*

A narcolepsia é causada pela deficiência de hipocretina devido à perda de neurônios hipotalâmicos produtores desse neuropeptídeo. Acredita-se que a fisiopatologia da narcolepsia acontece por um distúrbio auto-imune, embora essa hipótese não seja ainda confirmada. Através do modelo narcoléptico de camundongo transgênico e de pacientes narcolépticos, Cvetkovic-Lopes et al. (2010) identificaram esses neuropeptídeos enriquecido nos neurônios produtores de hipocretina, trabalhando na hipótese de que poderiam servir como potenciais alvos auto-ímunes. As análises iniciais indicaram que a transcrição de codificação "Tribbles homólogo 2" Trib2, previamente identificado como um auto-antígeno na urtiga auto-imune, foi enriquecido com neurônios de hipocretina nestes animais. A técnica de imunoensaio ELISA mostrou que soros de pacientes com narcolepsia com cataplexia apresentaram mais anticorpos específicos "Trib2" comparação com pacientes normais, ou seja, pacientes com hipersonolência idiopática, esclerose múltipla ou outras desordens neurológicas inflamatórias. Os anticorpos "Trib2"

específicos apresentaram aumento após o início da narcolepsia, diminuíram acentuadamente dentro de 2-3 anos e estabilizaram, porém em níveis mais elevados, em até 30 anos. Os autores observaram que o aumento dos anticorpos específicos "Trib2" está correlacionado com a gravidade da cataplexia. O soro de um paciente apresentou imunoreatividade específica com mais de 86% dos neurônios de hipocretina no hipotálamo do camundongo. Conclui-se que a narcolepsia é uma desordem auto-imune devido a identificação dos anticorpos relativo à narcolepsia humana.

#### Farmacoterapia

O ácido gama-hidroxibutírico é normalmente encontrado no cérebro em baixas concentrações e podem funcionar como um neurotransmissor e tem sido usado como anestésico geral e no tratamento da narcolepsia e alcoolismo. Schnackenberg et al. (2010) trabalharam na hipótese das alterações comportamentais e neuroquímicas e as mudanças de expressão gênica do cérebro após a administração dessa substância. Através da administração de soro fisiológico (efeito placebo) e de 500 mg/kg do do ácido gama-hidroxibutírico em camundongo macho da linhagem C57/B6N foram administrados uma única dose que foram sacrificados 1, 2 e 4 h após o tratamento. Os resultados mostraram que o ácido gama-hidroxibutírico induz alterações de expressão gênica no hipocampo, córtex e estriado. Esses genes expressos diferencialmente podem estar envolvidos em doenças neurológicas, apoptoses e estresse oxidativo.

A cafeína, um antagonista dos receptores A1 e A2 de adenosina, é um estimulante amplamente consumido e também usado nos casos de hipersonia. No entanto, a potência da cafeína é questionada por não ser forte o suficiente para evitar a sonolência excessiva. Em altas doses, pode induzir efeitos colaterais. No fígado humano, a cafeína é metabolizada em paraxantina, teobromina e teofilina. A paraxantina é um estimulante do sistema nervoso central e apresenta ação em receptores A1 e A2 de adenosina, mas tem menor toxicidade e efeitos ansiogênicos quando comparado com a cafeína.

Okuro et al. (2010) avaliaram a eficácia da paraxantina, cafeína, e do modafinil em camundongos com narcolepsia (orexina/ataxin-3 transgênicos) e do tipo selvagem. Esses animais foram submetidos à administração oral de 3 doses de cada composto. Os pesquisadores observaram que a paraxantina, a cafeína e o

modafinil promoveram vigília e redução do sono não-REM e REM em ambos os genótipos. A potência de promoção da vigília através do uso de 100mg/kg de paraxantina durante o período diurno da vigília, corresponde aproximadamente a administração de 200 mg/kg de modafinil. A potência de promoção da vigília através da paraxantina é maior e duradouro do que a concentração equimolar de cafeína, quando foram administradas durante o período diurno. A potência de promoção de paraxantina, cafeína e modafinil estão associadas com o aumento na atividade locomotora e da temperatura corporal. No entanto, as doses altas de cafeína e do modafinil induziram a hipotermia e a redução da atividade locomotora, confirmando uma menor toxicidade pela paraxantina. As avaliações comportamentais de ansiedade em camundongos selvagens revelaram que paraxantina induz menos ansiedade do que a cafeína. Segundo esses autores, além de fornecer neuroproteção, a paraxantina pode ser um agente de promoção da vigília e ajudar no combate de hipersonias associadas com doenças neurodegenerativas.

#### Discussão

O camundongo é o mamífero mais usado nos estudos da narcolepsia devido a similaridade com os humanos em relação a esta doença. Outro motivo pelo uso desse modelo animal é o seu baixo custo, facilidade de mantê-los em laboratórios e em lugares restritos, e o seu rápido desenvolvimento, reprodução e maturidade. O camundongo é um dos modelos animais de referência para diversas ciências, principalmente para os avanços na narcolepsia.

A associação do peixe zebra nos estudos da Medicina do Sono humana foi bastante interrogada por serem espécies tão distintas. O sono do zebrafish acontece principalmente no período noturno, como nos seres humanos, e apresenta uma organização do sistema nervoso central semelhante a dos mamíferos. A sua transparência facilita o estudo das redes neuronais in vivo e as regulações monoaminérgicas, colinérgicas e do grupo de células hipocretinérgicas dos mamíferos são bastante preservadas.

O sono do peixe zebra (*Danio rerio*) e dos seres humanos acontece principalmente no período noturno. Assim como os mamíferos, a restrição do sono nesses animais mostrou um efeito rebote: depois de uma privação do sono, após estimulação elétrica, eles dormiram mais, como parte de um mecanismo de regulação homeostática. Em relação à luz constante durante

3 dias, o peixe zebra apresentou uma supressão do sono sem efeito rebote (sem aumento compensatório do sono) quando foram devolvidos a escuridão, apresentando o sono normal. Este fenômeno é semelhante em aves e pode ser explicado devido a sensibilidade à luz de todas as células e a supressão da produção de melatonina no peixe zebra, superando o ciclo circadiano e a pressão homeostática que influencia no sono, o que o diferencia dos mamíferos. O peixe zebra é um importante modelo genético por partilhar uma organização do sistema nervoso central semelhante a dos mamíferos. A sua transparência facilita o estudo das redes neuronais in vivo e para os estudos do sono, e as regulações monoaminérgicas e colinérgicas e o grupo de células hipocretinérgicas dos mamíferos são bastante preservadas no modelo do peixe zebra. A resposta a diversas drogas hipnóticas, como os antagonistas histaminérgicos H1, agonistas de melatonina e alfa-2, e moduladores gabaérgicos também estão conservados no peixe zebra.

### Conclusão

Os mecanismos neurobiológicos, fisiopatológicos e a farmacoterapia da narcolepsia são totalmente esclarecidos. Os modelos animais são importantes na compreensão e nos avanços científicos desta doença.

### Referências

- ANACLET C.; PARMENTIER R.; OUK K.; GUIDON, G.; BUDA C.; SASTRE J.P., AKAOKA, H, SERGEEVA O.A.; YANAGISAWA, M.; OHTSU, H.; FRANCO, P.; HAAS, H.L.; LIN, J.S. Orexin/hypocretin and histamine: distinct roles in the control of wakefulness demonstrated using knock-out mouse models. **J Neurosci.** 18;29(46):14423-38, 2009
- APPELBAUM, L.; SKARIAH, G.; MOURRAIN, P.; MIGNOT, E. Comparative expression of p2x receptors and ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in hypocretin and sensory neurons in zebrafish. **Brain Res.**, oct 12, 1174:66-75, 2007.
- CVETKOVIC-LOPES, V.; BAYER, L.; DORSAZ, S.; MARET, S.; PRADERVAND, S.; DAUVILLIERS, Y.; LECENDREUX, M.; LAMMERS, G.J.; DONJACOUR, C.E.; DU PASQUIER, R.A.; PFISTER, C.; PETIT, B.; HOR, H.; MÜHLETHALER, M.; TAFTI, M. Elevated Tribbles homolog 2-specific antibody levels in narcolepsy patients. **J Clin Invest.** 1;120(3):713-9, 2010.
- DINIZ BEHN, C.G.; KLERMAN, E.B.; MOCHIZUKI, T.; LIN, S.C.; SCAMMELL, T.E. Abnormal sleep/wake dynamics in orexin knockout mice. **Sleep.** 1;33(3):297-306, 2010.
- FUJIKI, N.; YOSHIDA, Y.; ZHANG, S.; SAKURA, T.; YANAGISAWA, M.; NISHINO, S. Sex difference in body weight gain and leptin signaling in hypocretin/orexin deficient mouse models. **Peptides.**27(9):2326-31, 2006
- JONES, R. Let sleeping zebrafish lie: a new model for sleep studies. **Plos Biol.**, 5(10):e281, 2007.
- KALOGIANNIS, M.; GRUPKE, S.L.; POTTER, P.E.; EDWARDS, J.G.; CHEMELLI, R.M.; KISANUKI, Y.Y; YANAGISAWA, M.; LEONARD, C.S. Narcoleptic orexin receptor knockout mice express enhanced cholinergic properties in laterodorsal tegmental neurons. **Eur J Neurosci.**, 32(1):130-42, 2010.
- MÄKELÄ K.A.; WIGREN, H.K.; ZANT, J.C.; SAKURAI, T.; ALHONEN, L.; KOSTIN, A.; PORKKA-HEISKANEN, T.; HERZIG, K.H. Characterization of sleep-wake patterns in a novel transgenic mouse line overexpressing human prepro-orexin/hypocretin. **Acta Physiol (Oxf).** Mar;198(3):237-49, 2010.
- OKURO, M.; FUJIKI, N.; KOTORII, N.; ISHIMARU, Y.; SOKOLOFF, P.; NISHINO, S. Effects of paraxanthine and caffeine on sleep, locomotor activity, and body temperature in orexin/ataxin-3 transgenic narcoleptic mice. **Sleep.** 1;33(7):930-42, 2010
- SCHNACKENBERG, B.J.; SAINI, U.T.; ROBINSON, B.L.; ALI, S.F.; PATTERSON, T.A. An acute dose of gamma-hydroxybutyric acid alters gene expression in multiple mouse brain regions. **Neuroscience.** 2010 Jul 30.
- ZHANG, S.; ZEITZER, J. M.; SAKURAI, T.; NISHINO, S.; MIGNOT, E. Sleep/wake fragmentation disrupts metabolism in a mouse model of narcolepsy. **J Physiol.** Mar 22, 2007.
- WILLIE, J.T.; TAKAHIRA, H.; SHIBAHARA, M.; HARA, J.; NOMIYAMA, M.; YANAGISAWA, M.; SAKURAI T. Ectopic Overexpression of Orexin Alters Sleep/Wakefulness States and Muscle Tone Regulation during REM Sleep in Mice. **J Mol Neurosci.** 2010 Aug 14.
- YOKOGAWA, T.; WILFREDO, M.; FARACO, J.; PÉZERIN, G.; APPELBAUM, L.; ZHANG, J.; ROSA, F.; MOURRAIN, P.; MIGNOT, E. Characterization of sleep in zebrafish and insomnia in hypocretin receptor mutants. **Plos Biol.**, oct., 5(10): e277, 2007.