

**EL SISTEMA HIPOCRETINA / OREXINA EN LA  
FISIOPATOLOGÍA DE LAS HIPERSOMNIAS DE  
ORIGEN CENTRAL**

**José Enrique Martínez Rodríguez**





JOAN SANTAMARIA CANO, Profesor Asociado de Medicina de la Universidad de Barcelona,

y

FRANCESC GRAUS RIBAS, Profesor Titular Interino de Medicina de la Universidad de Barcelona,

Certificamos que la memoria titulada “*El sistema hipocretina / orexina en la fisiopatología de las hipersomnias de origen central*”, presentada por José Enrique Martínez Rodríguez, se ha realizado bajo nuestra dirección y consideramos que reúne las condiciones necesarias para ser defendida ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor en medicina y cirugía.

Dr. Joan Santamaria Cano

Dr. Francesc Graus Ribas

Barcelona, 17 de Noviembre de 2006



## **Agradecimientos**

Al Dr.Santamaria, por su iniciativa en el desarrollo de este proyecto de tesis y por la metodología que aprendí al realizarla.

Al Dr.Graus, por enseñarme a prestar atención a aquello que no siempre se escribe en los libros.

A Merçe Bonastre, Eva Caballero y Lidia Sabater, por su apoyo y tutela en el laboratorio, ese campo que tan extraño puede llegar a ser al principio para un clínico.

A la Dra.Ling Lin y Dr.Casamitjana, por su ayuda en el desarrollo y realización de las técnicas de radioinmunoanálisis, y al Dr.Iranzo, por sus enseñanzas en los trastornos del sueño.

Al Dr.Emmanuel Mignot, por haber compartido conmigo sus conocimientos y entusiasmo en el estudio del sueño normal y patológico.

A todos los pacientes con narcolepsia e hipersomnia central, por su extraordinaria disposición a la hora de intentar comprender su enfermedad.



*A Isabel, por sus consejos y paciencia*

*A mis padres,  
por su apoyo incondicional y haberme enseñado los valores  
más importantes en la vida*





## GLOSARIO DE ABREVIATURAS:

<b>DE</b> .....	Desviación estandar.
<b>DMI</b> .....	Distrofia miotónica tipo I.
<b>ECJ</b> .....	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.
<b>EEG</b> .....	Electroencefalograma
<b>ESD</b> .....	Excesiva somnolencia diurna.
<b>Hcrt-1</b> .....	Hipocretina-1.
<b>Hcrt-2</b> .....	Hipocretina-2.
<b>Hctr1</b> .....	Receptor 1 de hipocretina.
<b>Hctr2</b> .....	Receptor 2 de hipocretina.
<b>HI</b> .....	Hipersomnia idiopática.
<b>HLA</b> .....	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (antígenos leucocitarios humanos).
<b>ICSD-2</b> .....	<i>International Classification of Sleep Disorders</i> , segunda edición.
<b>ILF</b> .....	Insomnio letal familiar.
<b>LCR</b> .....	Líquido cefalorraquídeo.
<b>LDT/PPT</b> .....	Núcleos laterodorsal / pedunculopontino.
<b>MCH</b> .....	<i>Melanin-concentrating hormone</i> (hormona concentradora de melanina)
<b>MSLT</b> .....	<i>Mean Sleep Latency Test</i> (test de latencias múltiples de sueño).
<b>NC</b> .....	Narcolepsia-cataplejía.
<b>NnC</b> .....	Narcolepsia sin cataplejía.
<b>NREM</b> .....	Sueño no REM.
<b>NSQ</b> .....	Núcleo supraquiasmático.
<b>REM</b> .....	<i>Rapid eye movement sleep</i> (sueño de movimientos oculares rápidos).
<b>SOREM</b> .....	<i>Sleep onset REM</i> (inicios de sueño en REM).
<b>SNC</b> .....	Sistema Nervioso Central
<b>VLPO</b> .....	<i>Ventrolateral posterior area</i> (área ventrolateral posterior).



# ÍNDICE GENERAL

<b>X. Prólogo.</b> .....	1
<b><u>I.- INTRODUCCIÓN:</u></b> .....	3
<b>I.1.- La narcolepsia</b> .....	3
<b>I.2.- El sistema hipocretina / orexina</b> .....	9
<b>I.3.- Neurobiología de la regulación del ciclo sueño / vigilia</b> .....	15
<b>I.4.- La determinación de Hcrt-1 en líquido cefalorraquídeo como marcador biológico del sistema hipocretina / orexina</b> .....	21
I.4.1.- Aspectos generales y específicos del estudio del LCR en los trastornos de la vigilia y el sueño. ....	21
I.4.2.- Estudio del sistema hipocretina / orexina en LCR en trastornos de la vigilia y el sueño. ....	25
<b>I.5.- Narcolepsia y autoinmunidad</b> .....	29
<b>I.6.- Trastornos de la vigilia y el sueño en otras enfermedades neurológicas</b> .....	33
I.6.1.- La enfermedad de Steinert. ....	33
I.6.2.- Insomnio letal familiar. ....	34
<b><u>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u></b> .....	35
<b>II.1.- Hipótesis.</b> .....	35
<b>II.2.- Objetivos.</b> .....	36
<b><u>III. PACIENTES Y MÉTODOS</u></b> .....	37
<b>III.1.- Pacientes.</b> .....	37
<b>III.2.- Métodos.</b> .....	38

<b><u>IV. RESULTADOS</u></b> .....	39
<b>IV.1. Trabajo 1:</b> Análisis comparativo de un grupo de pacientes con narcolepsia-cataplejía, narcolepsia sin cataplejía e hipersomnía idiopática. ....	39
<b>IV.2. Trabajo 2:</b> Evaluación de la autoinmunidad hipotálamo-específica en la narcolepsia. ....	41
<b>IV.3.- Trabajo 3:</b> Niveles reducidos de hipocretina-1 (orexina-A) en líquido cefalorraquídeo de pacientes con distrofia miotónica y excesiva somnolencia diurna. ....	45
<b>IV.4.- Trabajo 4:</b> Niveles normales de hipocretina-1 en líquido cefalorraquídeo de pacientes con insomnio letal familiar. ....	47
<b><u>V. DISCUSIÓN GENERAL</u></b> .....	49
<b><u>VI. CONCLUSIONES</u></b> .....	53
<b><u>VII. BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	55



## PRÓLOGO

El sueño puede ser definido como un proceso fisiológico regulado de forma activa por el sistema nervioso central caracterizado por periodos reversibles de inmovilidad y una reducción de la respuesta a estímulos externos. A pesar de ser un estado de actividad cerebral en el cual un individuo pasa aproximadamente un tercio de su vida, al inicio del siglo XXI, las funciones exactas del sueño persisten como un enigma para la comunidad científica, postulándose funciones de reorganización de la actividad cerebral, conservación de energía, y consolidación de memoria, entre otras. Profundizar en el conocimiento del sueño no sólo podrá ayudarnos a entender este proceso vital para la vida, sino que podrá arrojar luz en el entendimiento de su estado complementario, la vigilia o consciencia.

La necesidad innata de dormir en la mayoría de seres vivos es probablemente debida a una dirección evolutivamente dirigida en base a la necesidad del alto procesamiento neuronal requerido para la integración de estímulos del medio externo, principalmente visuales (1). El sueño presenta variaciones entre las distintas especies estudiadas y está sujeto a múltiples factores ecológicos, estando ligado en mamíferos grandes a un tamaño cerebral elevado y a la homeotermia.

Desde el descubrimiento del sueño REM (*Rapid Eye Movements*) por Aserinsky en 1953 (2), se conoce que el sueño no es meramente un proceso pasivo sino un estado con una alta actividad cerebral en el que se alternan fases de sueño NREM (sueño no REM) y REM controlado principalmente por interacciones recíprocas monoaminérgicas y colinérgicas en el diencéfalo y tronco cerebral (3). El sueño NREM se caracteriza por una sincronización de la actividad eléctrica cerebral tálamo-cortical y una actividad de ondas lentas en el EEG. El sueño REM normal representa un 20-25 % del sueño de un adulto, y básicamente se caracteriza por parálisis en la musculatura voluntaria con

excepción del diafragma y la musculatura ocular extrínseca, presencia de movimientos oculares rápidos y aparición de sueños vívidos. Suele ocurrir a los 60-90 minutos del inicio del sueño y, por lo general, aparece en 3 a 4 fases durante una noche que van incrementando su duración a lo largo de la misma. Este ciclo de sueño NREM-REM se encuentra presente en prácticamente todos los mamíferos estudiados, lo que da idea de su importancia funcional.

En los últimos años, el estudio del sueño normal y patológico ha sufrido grandes avances gracias al conocimiento de la fisiopatología de la narcolepsia. Esta enfermedad es la única conocida en la que la organización y estructura del sueño están alteradas de forma primaria. En el presente trabajo de tesis se introducirá primeramente la narcolepsia como enfermedad clave dentro de los trastornos del ciclo sueño / vigilia para conocer la organización normal del sueño, haciendo especial énfasis en su fisiopatología y, posteriormente, en la implicación del sistema hipocretina / orexina en la misma, incluyendo estos hallazgos en el funcionamiento básico del sistema nervioso central (SNC) en la regulación del ciclo sueño / vigilia. El trabajo de investigación tratará de evaluar el estado biológico del sistema hipocretina / orexina en diversas enfermedades del SNC con hipersomnia de origen central y la implicación de este sistema neurotransmisor en la fisiopatología de las mismas, abordando en la narcolepsia el estudio de la hipótesis autoinmune contra el sistema hipocretina / orexina.

## **I.- INTRODUCCIÓN:**

### **I.1.- LA NARCOLEPSIA**

La narcolepsia es una enfermedad crónica caracterizada clínicamente por excesiva somnolencia diurna (ESD) y manifestaciones derivadas de una alteración de la regulación del sueño REM, entre las que se encuentra la cataplejía como el síntoma más específico de la enfermedad. El término narcolepsia fue utilizado por primera vez por Gelineau en 1880 para describir un paciente con somnolencia excesiva y episodios de debilidad muscular desencadenados por emociones. En 1957 se añadieron a la descripción sindrómica la presencia de parálisis de sueño y alucinaciones hipnopómpicas / hipnagógicas, y desde 1975 se incorpora la presencia de sueño nocturno fragmentado como pentada clínica característica.

La morbilidad de la narcolepsia puede llegar a ser considerable, con una importante repercusión en la vida social y laboral del individuo. La prevalencia de la narcolepsia es de 1 caso por cada 2.000 a 4.000 individuos según las series, y una edad de inicio generalmente en la adolescencia. Hasta la fecha, se ha descrito un caso aislado de narcolepsia de inicio precoz en un paciente con una mutación del gen de la preprohipocretina (4), y algunos locus de susceptibilidad en casos familiares de narcolepsia en el cromosoma 21q22 (5) y 4p13-q21 (6). Sin embargo, la mayoría de casos son de presentación esporádica sobre una base genética que influye en el desarrollo de la enfermedad. El riesgo de presentar la enfermedad en familiares de primer grado es de un 2%, lo que implica un valor 10 a 40 veces mayor que la población general, y el riesgo de padecer la enfermedad en gemelos monocigotos es de un 25-31% (7). La narcolepsia también puede aparecer de forma secundaria en lesiones focales del



SNC, generalmente en la región hipotalámica posterior (8). Se postula, por tanto, que en el desarrollo de narcolepsia interactúan factores ambientales sobre una base de susceptibilidad genética, todo ello originando un fenotipo común con distintas fisiopatologías probables.

La narcolepsia se caracteriza por una alteración del control del ciclo sueño-vigilia. Los pacientes narcolépticos no presentan una cantidad aumentada de sueño total al día, ni tampoco tienen alteraciones circadianas de los ritmos biológicos, sino que, característicamente, tienen una inestabilidad del ciclo sueño / vigilia. La ESD está relacionada con una hipoactividad dopaminérgica no nigroestriada, y la cataplejía con un tono monoaminérgico reducido junto con una hipersensibilidad colinérgica en el tronco cerebral (9). El descubrimiento reciente del sistema hipocretina / orexina y su implicación en la fisiopatología de la narcolepsia han permitido profundizar en el conocimiento de esta enfermedad y en la organización normal del ciclo sueño / vigilia, así como disponer de una posible prueba diagnóstica biológica para esta enfermedad.

Clínicamente, la ESD suele ser el primer síntoma en aparecer, caracterizada por una tendencia anormal a dormirse en situaciones de pasividad o incluso de actividad relativa, sin poseer esta somnolencia ninguna característica que la pueda diferenciar de la presentada en otras entidades nosológicas. Derivado de la ESD, el paciente narcoléptico puede presentar otros síntomas como ataques de sueño incoercibles y conductas automáticas. La presencia de episodios de sueño reparador de corta duración es característica de la enfermedad.

La cataplejía se define como la pérdida súbita y transitoria del tono muscular desencadenada por emociones sin pérdida de conocimiento. La cataplejía es prácticamente patognomónica de la enfermedad, aunque también puede verse en otras

entidades como la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, el síndrome de Prader-Willi, la enfermedad de Norrie y la encefalitis paraneoplásica anti-Ma2, entidades que dada su presentación clínica, suelen permitir un diagnóstico diferencial correcto. La frecuencia de presentación de la cataplejía es variable en cada paciente, y con una duración que suele ser de segundos, raramente minutos. De forma excepcional, sobre todo tras la retirada brusca de medicación anticatapléjica, los ataques pueden durar varias horas, o presentarse ante mínimos estímulos emocionales, lo que se conoce con el nombre de estado de mal catapléjico (10). Hasta un 25% de narcolépticos nunca presentan cataplejía, lo que se conoce como *narcolepsia sin cataplejía*, pudiendo tratarse de enfermos con una expresión clínica incompleta de narcolepsia-cataplejía, o bien, de una entidad distinta (11).

Además de la cataplejía, otros síntomas derivados de la regulación anormal del sueño REM son la parálisis de sueño, presente en un 20-50% de casos, y las alucinaciones hipnagógicas e hipnopómpicas, presentes hasta en un 30%. Ambos síntomas aparecen en periodos de transición entre el sueño y la vigilia, aunque son menos específicos dada su presentación clínica en sujetos normales. El quinto síntoma característico de la narcolepsia, la fragmentación del sueño nocturno, deriva de la imposibilidad de estos pacientes de mantener tanto la vigilia como el sueño durante periodos prolongados. La narcolepsia también se ha asociado con un aumento de un 10-20% del índice de masa corporal (12).

En los estudios electrofisiológicos, el test de latencias múltiples de sueño (MSLT, *Mean Sleep Latency Test*) es la prueba más útil en la narcolepsia, mostrando una latencia media de sueño reducida, así como varios inicios de sueño en REM (SOREM, *Sleep Onset REM*), hallazgos relacionados con la ESD y la presión

excesivamente alta del sueño REM, respectivamente. En el polisomnograma nocturno, los pacientes suelen presentar una disminución de la latencia del sueño REM y alteraciones del tono muscular durante la fase REM, pudiendo presentarse con frecuencia un trastorno de conducta del sueño REM.

Según los criterios actuales de diagnóstico de la ICSD-2 (*International Classification of Sleep Disorders*, segunda edición) (13), la narcolepsia se clasifica dentro de las hipersomnias centrales junto con la narcolepsia sin cataplejía y la hipersomnia idiopática, entidades que forman parte de su diagnóstico diferencial. Los pacientes con ESD y presencia de cataplejía se diagnostican como narcolepsia-cataplejía (NC), aquellos pacientes con ESD sin cataplejía y presencia de  $\emptyset$  SOREMs en el MSLT se diagnostican como narcolepsia sin cataplejía (NnC), y los pacientes con ESD sin cataplejía ni SOREMs en el MSLT reciben el diagnóstico de hipersomnia idiopática (HI). El diagnóstico diferencial de estas entidades se ve muchas veces dificultado debido a la presencia no siempre bien definida de cataplejía y la ausencia de SOREMs en el MSLT en un 15% de narcolépticos (14,15). Adicionalmente, la presencia de SOREMs no es específica, y puede estar presente en sujetos normales y hasta en un 4,7% de pacientes con apneas del sueño en correlación con las desaturaciones de oxihemoglobina (16).

La presencia de una dificultad prolongada en el despertar por la mañana (*sleep drunkenness*) y un sueño nocturno prolongado (>10 horas) se ha incorporado en el ICSD-2 como síntomas sugestivos de HI. Adicionalmente, la determinación de hipocretina en líquido cefalorraquídeo (LCR) ha sido añadida como prueba de utilidad diagnóstica en determinados casos de hipersomnias centrales dada su alta sensibilidad y especificidad para la narcolepsia.

**Martínez-Rodríguez JE, Iranzo A, Santamaria J.**

**Narcolepsia.**

**Med Clin 2002; 119: 749-754.**



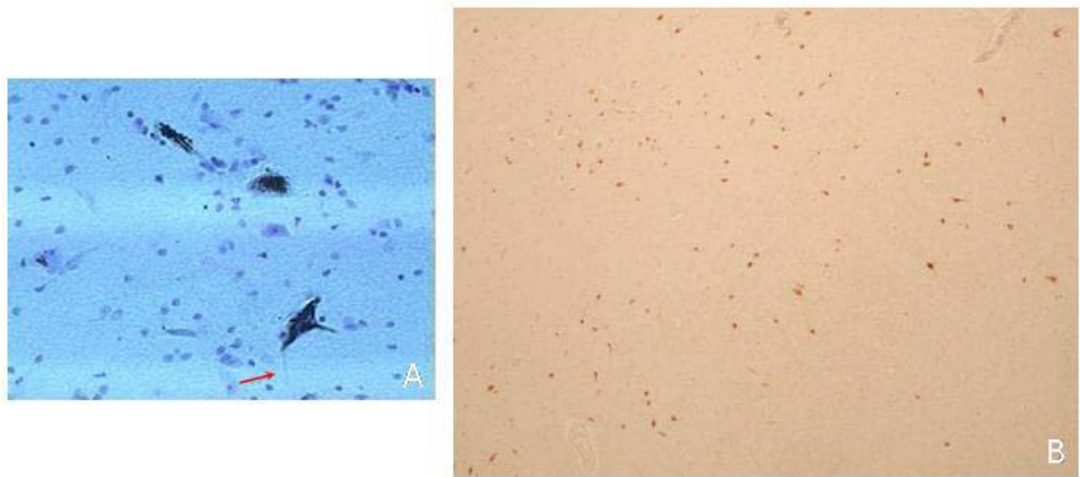
## **I.2.- EL SISTEMA HIPOCRETINA / OREXINA**

El sistema hipocretina fue descubierto por de Lecea en 1998 al estudiar ARNm específicos de hipotálamo por técnicas de substracción de tag-PCR, describiendo la molécula de la preprohipocretina y sus dos péptidos derivados, la hipocretina-1 e hipocretina-2, localizados en vesículas sinápticas y con propiedades neuroexcitadoras (17). Otro grupo investigador, mediante purificación y aislamiento de ligandos de receptores huérfanos acoplados a proteínas G, aisló dos receptores que se unían a dos moléculas, identificadas como orexina A y B (18). Posteriormente, se comprobó que las moléculas identificadas como hipocretina y orexina eran las mismas, empleándose actualmente ambos términos como sinónimos.

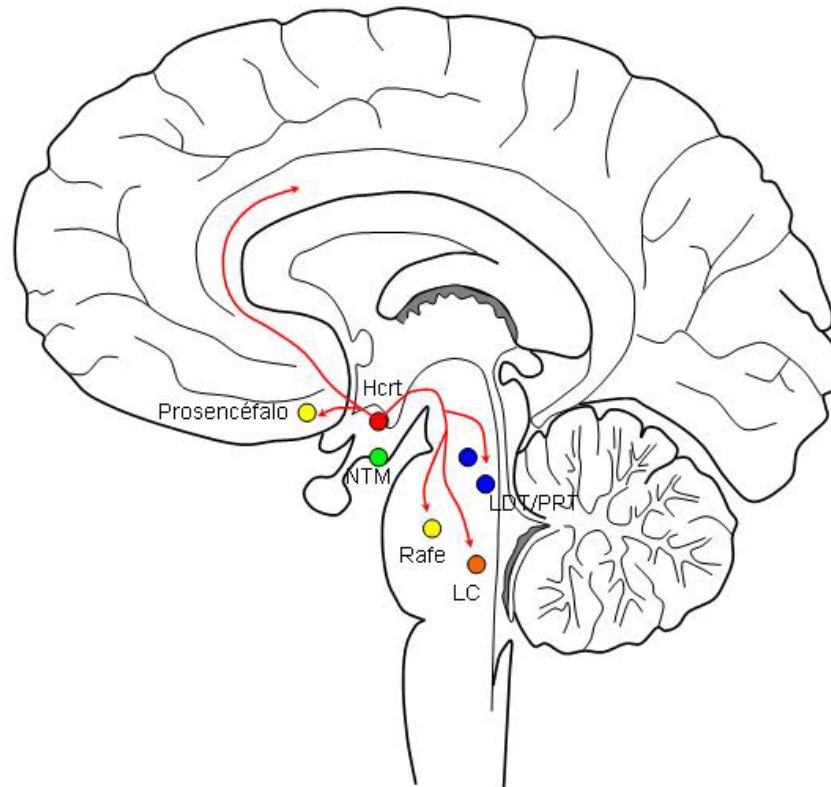
El sistema consta de una molécula precursora, la preprohipocretina, sintetizada por un gen situado en el hombre en el cromosoma 17. De esta molécula surgen dos proteínas, la hipocretina-1, de 33 aminoácidos y con dos puentes disulfuro en su estructura, y la hipocretina-2, de 28 aminoácidos (17,18). Los dos receptores del sistema hipocretina se superponen de forma solapada por el SNC (19). El primer receptor (Hcrtr1) presenta afinidad selectiva a Hcrt1, y el segundo receptor (Hcrtr2) igual afinidad para Hcrt1 y Hcrt2.

Las neuronas hipocretinérgicas están localizadas en el área perifornical del hipotálamo posterior, área hipotalámica lateral e hipotálamo dorsomedial (17,18) (Figura 1), con múltiples proyecciones a lo largo del SNC, principalmente a áreas monoaminérgicas y colinérgicas involucradas en la regulación de ciclo sueño / vigilia (20) (Figura 2). Concretamente, las conexiones con el área tuberomamilar juegan un papel crucial en el mantenimiento de la vigilia, y las proyecciones al locus coeruleus participan en el control del tono muscular (21). Una de las principales regiones eferentes

del área hipocretinérgica es a esta última región, donde la Hcr1 activa neuronas noradrenérgicas por medio de receptores Hcr1 (22,23). Las aferencias al sistema hipocretinérgico parten principalmente del área ventrolateral preóptica (VLPO), prosencéfalo, amígdala y núcleos serotoninérgicos del rafe (24).



**Figura 1. A)** Neuronas hipocretinérgicas de hipotálamo canino marcadas con anticuerpo anti-hipocretina-2. La flecha indica la prolongación axonal de una neurona hipocretinérgica. **B)** Cúmulo de neuronas hipocretinérgicas marcadas con anti-hipocretina-2 en una sección de hipotálamo posterior de un paciente con atrofia multisistémica.



**Figura 2.** Principales proyecciones eferentes del sistema hipocretina (Hcrt). NTM: núcleo tuberomamilar. LDT/PPT: núcleos laterodorsal / pedúnculo pontino. LC: locus coeruleus.

Debido a su localización en la región dorsolateral del hipotálamo, y al aumento de la ingesta producida al administrarla intraventricularmente en roedores, inicialmente se postuló que el sistema hipocretinérgico estaría implicado en la regulación de la alimentación (18). Sin embargo, en 1999 se describió por primera vez la involucración de este sistema en la fisiopatología de la narcolepsia en el modelo canino de la enfermedad. Este modelo animal ha permitido realizar numerosos estudios fisiológicos y farmacológicos desde la década de los setenta. En perros, la enfermedad es similar al hombre en cuanto a la presencia de ataques de cataplejía, pero difiere en cuanto a la excesiva somnolencia diurna debido a la diferente organización del sueño en los primeros. Adicionalmente, mientras que en humanos, la enfermedad es esporádica, en los perros labradores y Dobermans la enfermedad se hereda de forma autosómica



recesiva con alta penetrancia, aunque también existen casos esporádicos con una fisiopatología distinta. Por medio de técnicas de clonamiento posicional, Mignot et al aislaron una mutación en el gen del receptor 2 de hipocretina en perros narcolépticos (25). Unos meses después, otro grupo investigador describe la presencia de síntomas sugestivos de narcolepsia en ratones *knockout* para preprohipocretina (26). En otro modelo animal de ratones transgénicos en los que se induce la expresión de ataxina-3 en neuronas hipocretinérgicas y la consiguiente muerte celular por apoptosis de las mismas, los animales desarrollan un fenotipo narcoléptico con la presencia de episodios de inmovilidad, entradas súbitas en sueño REM, falta de consolidación del sueño y una obesidad tardía a pesar de una ingesta total reducida (27). Estudios posteriores en los que se compararon ratones transgénicos deficientes en preprohipocretina y en *Hcrtr2*, observaron un mayor número de episodios sugestivos de cataplejía en el primer modelo, con una presencia similar de episodios de sugestivos de ataques de sueño en ambos modelos (28).

En humanos, se reportó por primera vez una disfunción del sistema hipocretina en la narcolepsia al descubrir una deficiencia de *Hcrt-1* en el LCR en 7 de 9 pacientes con narcolepsia (29). Así mismo, se describió un paciente con una mutación en el gen de la preprohipocretina con desarrollo de narcolepsia y cataplejía a una edad de 6 meses (4). Otros estudios posteriores confirmaron la deficiencia de hipocretina en LCR en la mayoría de pacientes narcolépticos con cataplejía (30-33). Estudios anatomopatológicos en la narcolepsia humana han revelado un 85-95% de pérdida de neuronas hipocretinérgicas en el hipotálamo lateral de pacientes narcolépticos (4,34). Las neuronas productoras de MCH (*Melanin-Concentrating Hormone*), intercaladas entre las hipocretinérgicas, están respetadas en este proceso. Las neuronas hipocretinérgicas coexpresan *Narp* (*Neuronal Activity-Regulated Pentraxin*) y dinorfina. Dado que la

mayoría de neuronas que expresan Narp y dinorfina en el hipotálamo posterior también expresan hipocretina, la reducción selectiva encontrada por técnicas de inmunohistoquímica e hibridación in situ de ambos marcadores en este área, pero no en otras áreas hipotalámicas no hipocretinérgicas, sugiere una pérdida neuronal específica de neuronas hipocretinérgicas (35,36). Hasta la fecha, sólo un estudio ha mostrado gliosis en el área hipocretinérgica, lo que podría sugerir un proceso inflamatorio local previo (34,37).

La función del sistema hipocretina presenta marcadas variaciones circadianas (38,39) derivadas de conexiones directas e indirectas entre el núcleo supraquiasmático (NSQ) (el reloj biológico del SNC) y las neuronas hipocretinérgicas (40-43). La actividad hipocretinérgica puede verse aumentada por la privación de sueño y la vigilia forzada (39,43-45), así como por la actividad locomotora (42,46-48). La actividad neuronal hipocretinérgica es más alta en condiciones emocionales y sensitivomotoras similares a los estímulos que desencadenan cataplejía en pacientes narcolépticos, y es silente en sueño NREM y en sueño REM tónico, con ocasionales descargas de actividad en el sueño REM fásico (49).

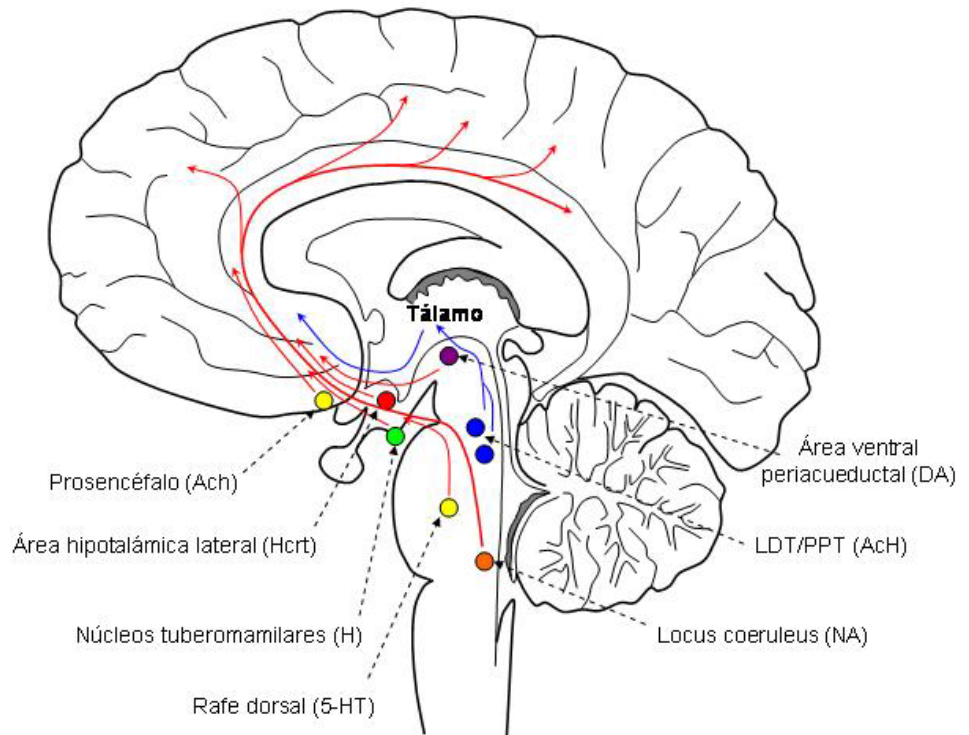
Además de una función en la regulación del ciclo sueño / vigilia, el sistema hipocretinérgico ha sido implicado en funciones de control de la alimentación (18,27), conductas de motivación (50), modulación del estrés (51), termorregulación y metabolismo (52), entre otras, todo ello probablemente debido al gran número de proyecciones e interacciones que presenta el sistema en el SNC.



### **I.3.- NEUROBIOLOGÍA DE LA REGULACIÓN DEL CICLO SUEÑO / VIGILIA**

Desde las descripciones iniciales de von Economo de casos de encefalitis letárgica (1918-1926), se conoce que el hipotálamo juega un papel primordial en el control del sueño y la vigilia, siendo el hipotálamo anterior un área inductora de sueño y el posterior promotor de vigilia (53). Junto al hipotálamo, otras regiones reguladoras del sueño y la vigilia se encuentran situadas en el prosencéfalo basal y en el tronco cerebral.

El sistema reticular activador ascendente promotor de vigilia tiene dos vías principales (figura 3). La primera vía, dirigida hacia el núcleo reticular talámico y con una función activadora de neuronas de relevo al córtex cerebral, proviene de los núcleos colinérgicos tegmental laterodorsal y pedunculopontino (LDT/PPT), y presenta una actividad elevada en vigilia y sueño REM, y una actividad reducida en sueño NREM. La segunda vía de activación de vigilia tiene proyecciones desde el locus coeruleus (noradrenalina), núcleos dorsales y mediales del rafe (serotonina), sustancia gris ventral periacueductal (dopamina) y núcleos tuberomamilares (histamina), al hipotálamo lateral (MCH, hipocretina) y prosencéfalo (acetilcolina, GABA), y de estas áreas, al neocórtex. Las neuronas de los núcleos monoaminérgicos tienen una actividad elevada en vigilia, disminuida en sueño NREM y son prácticamente silentes en sueño REM. Durante este último, las neuronas MCH son activas y la mayoría de neuronas hipocretinérgicas son silentes. Por el contrario, muchas neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal están activas en vigilia y sueño REM.



**Figura 3.** Representación esquemática de los principales sistemas neuronales ascendentes promotores de vigilia. DA: dopamina. ACh: acetilcolina. NA: noradrenalina. 5-HT: 5-Hidroxitriptamina (serotonina). Hcrt: hipocretina. H: histamina. LDT/PPT: núcleos laterodorsal / pedunculopontino.

Los principales núcleos neuronales promotores del sueño se encuentran en el VLPO, cuyas neuronas contienen los neurotransmisores inhibitorios GABA y galanina, y envían proyecciones a los grupos neuronales hipotalámicos y del tronco cerebral implicados en el mantenimiento de la vigilia (54). El VLPO se subdivide en dos zonas, el cúmulo principal con proyecciones a núcleos histaminérgicos, cuya lesión en animales provoca reducción del sueño NREM, y el área extendida, cuya lesión reduce el sueño REM debido a sus proyecciones directas al locus coeruleus y núcleo dorsal del rafe (55). Las aferencias del VLPO son inhibitorias desde los principales núcleos monoaminérgicos, o dicho de otro forma, se inhibe por el sistema de mantenimiento de vigilia.

El sueño REM se genera en el tronco cerebral, concretamente en el puente y mesencéfalo adyacente, por la interacción de neuronas colinérgicas y monoaminérgicas. Neuronas activadoras del sueño REM en el LDT/PPT originan una ausencia de tono muscular por inhibición de alfa-motoneuronas. La estimulación de determinadas regiones del puente con agonistas colinérgicos induce estados de sueño REM (56). Las neuronas del locus coeruleus y del rafe dorsal inhiben a neuronas promotoras del sueño REM durante la vigilia y el sueño NREM, volviéndose inactivas durante el sueño REM y facilitando, por tanto, este estado.

La hipótesis del circuito “flip-flop” expuesta por Saper para explicar la regulación del ciclo sueño / vigilia se basa en el concepto de reforzamiento de elementos positivos de un circuito al mismo tiempo que se inhiben los elementos inhibitorios sobre el mismo, en analogía a los circuitos electrónicos del mismo nombre (57). Este modelo evitaría los estados transicionales y favorecería la estabilidad a un lado u otro del circuito, de forma que nada más empezar a declinar un estado se pasaría rápidamente al contrario (57,58). Este sistema funcional estaría evolutivamente favorecido dado el potencial riesgo de una especie a permanecer largo tiempo en un estadio transicional entre el sueño y la vigilia, evitando los cambios bruscos entre un estado y otro. El circuito flip-flop estaría formado por el VLPO y los grupos neuronales monoaminérgicos. El sistema hipocretinérgico, activo en vigilia y especialmente durante la actividad locomotora, podría actuar en la consolidación de la vigilia estabilizando el circuito a este favor, reforzando las neuronas monoaminérgicas implicadas en el mantenimiento de la vigilia. Así, en la narcolepsia, enfermedad caracterizada por inestabilidad de la vigilia y el sueño, el déficit hipocretinérgico desestabilizaría la vigilia provocando transiciones rápidas a sueño REM.

El modelo de regulación del ciclo sueño / vigilia en función de procesos circadianos y homeostáticos propuesto por Borbely (59) podría encuadrarse adecuadamente dentro del modelo del flip-flop. Las influencias homeostáticas podrían estar mediadas por el acúmulo a lo largo del periodo de vigilia de ciertas sustancias en determinadas regiones cerebrales tendentes a inducir el sueño, con su posterior descenso durante el mismo. Concretamente, el prosencéfalo basal es la única región cerebral implicada en el mantenimiento de la vigilia en la que la acumulación de adenosina (producto de la degradación del ATP celular) induce el sueño (60), aunque estudios recientes parecen descartar a las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal como las responsables de esta acción (61).

El proceso circadiano contrarrestaría la propensidad progresiva al sueño del proceso homeostático, y al llegar la noche, las influencias circadianas descenderían, permitiendo la aparición del sueño. Las influencias circadianas están mediadas por el NSQ, el cual está constituido por neuronas que se encargan de generar el ritmo circadiano. Las neuronas del NSQ disponen de un mecanismo de retroalimentación genéticamente dirigido basado en la transcripción-traslación de determinados genes y sus proteínas derivadas, produciendo un ciclo de aproximadamente 24 horas, el cual es sincronizado a través del haz retinosupraquiasmático por la activación de las células ganglionares de la retina por la luz. Las proyecciones eferentes del NSQ inervan áreas implicadas en la regulación de la alimentación, secreción de hormonas como la melatonina y la hormona liberadora de corticotropina (CRH), así como áreas implicadas en la regulación del ciclo sueño / vigilia principalmente a través de relevos en la zona subparaventricular y en el núcleo dorsomedial hipotalámico (40,41), este último con importantes proyecciones gabaérgicas al VLPO y glutamatérgicas y de TRH (*Thyrotropin Releasing Hormone*) a neuronas hipocretinérgicas (41). El núcleo

dorsomedial integra la información del NSQ y la zona subparaventricular en la regulación de la alimentación, temperatura, patrones sociales y ambientales. Durante el día, las neuronas del NSQ están activas, y sus terminaciones gabaérgicas inhiben, entre otras, las neuronas del núcleo paraventricular, involucrado en la secreción de melatonina. Por la noche, la inhibición de este núcleo cesa y se produce la secreción de melatonina (41). Las conexiones multisinápticas del circuito circadiano permiten una flexibilidad para una adaptación alostética a un nicho ecológico determinado en función de estímulos luminosos, alimenticios y térmicos, adoptando un patrón de actividades fisiológicas y comportamentales diurno o nocturno, que puede variar en determinadas especies en función de cambios estacionales y de la abundancia de alimentos (58). El patrón final dependerá de la activación conjunta o alterna del núcleo dorsomedial con el NSQ, este último permaneciendo siempre acoplado al ritmo luz-oscuridad.





## **I.4.-LA DETERMINACIÓN DE HCRT-1 EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DEL SISTEMA HIPOCRETINA / OREXINA**

### **I.4.1.- Aspectos generales y específicos del estudio del LCR en los trastornos de la vigilia y el sueño.**

El LCR, al estar en un compartimento en relativo equilibrio con el fluido intersticial de las células del parénquima cerebral, proporciona un método reproducible, relativamente no invasivo y fácil de evaluar, de la funcionalidad de múltiples sistemas neuronales en el sueño normal y patológico. A este respecto, es importante recalcar que la presencia de un determinado neurotransmisor en el LCR puede no ser meramente pasiva. Las características fisiológicas del LCR podrían proporcionar a ciertos sistemas neurotransmisores el medio para funcionar en la comunicación intercelular de forma endocrina por transmisión de volumen, según una hipótesis ya descrita en 1910 por Cushing y Goetsch (62). Algunos sistemas neuronales, como el serotoninérgico y el hipocretinérgico (63,64) están en continuidad directa con células endimarias y el LCR. Hipotéticamente, este tipo de neurotransmisión podría jugar un papel importante en el ciclo sueño / vigilia, ya que actuaría como una modulación lenta y a largo plazo sobre diversos sistemas dispersos por el SNC produciendo una función sostenida que podría colaborar en el mantenimiento de las fases del ciclo (65).

Ciertas limitaciones metodológicas deben ser tenidas en cuenta a la hora de realizar estudios de LCR en general, y específicamente en el estudio del sueño normal y patológico. El complejo proceso de regulación del ciclo sueño / vigilia no puede ser simplificado en un análisis cuantitativo de una sustancia determinada en el LCR, por lo

que múltiples variables deben ser evaluadas a la hora del estudio. Las características clínicas de los sujetos en estudio, tales como edad, sexo, peso y altura, dieta, actividad motora previa, y tratamientos farmacológicos, deberían ser lo más homogéneas posibles. Con relación a la forma de obtención del LCR, pueden influir en los resultados la hora del día en que se realiza la toma de LCR en sustancias con variaciones circadianas, el lugar de la obtención en aquellas sustancias con un gradiente rostrocaudal en el LCR, la posible contaminación de la muestra con sangre, así como el tiempo y la forma de almacenaje de la muestra.

Así mismo, los resultados obtenidos en LCR pueden no guardar relación con el estado de una determinada sustancia en su lugar de acción en el SNC, ya que su origen puede derivar de múltiples fuentes o predominar de una concreta que sea distinta al lugar de estudio hipotetizado. También puede haber un retraso en la liberación al LCR que mitigue una posible relación temporal con un estado de sueño o vigilia. Una alteración parcial o escasa de un sistema neurotransmisor puede no reflejarse en los niveles de LCR, ni tampoco éstos son útiles para el estudio de posibles alteraciones funcionales a nivel postsináptico. En general, es necesario conocer la circulación, distribución y metabolismo de una sustancia en el LCR para la correcta interpretación de un estudio.

**Martínez-Rodríguez JE, Santamaria J.**

**CSF markers in sleep neurobiology.**

**Clin Chim Acta 2005; 362: 12-25.**



#### **I.4.2.- Estudio del sistema hipocretina / orexina en LCR en trastornos de la vigilia y el sueño.**

De los dos neurotransmisores del sistema hipocretinérgico, la Hcrt-1 es estable en LCR permitiendo su medición en este fluido, a diferencia de la Hcrt-2. Los estudios iniciales de LCR se realizaron mediante extractos de LCR por columnas Sep-Pack C18. Posteriormente, se comprobó que las mediciones de forma directa en LCR eran iguales de consistentes que la determinación indirecta, siendo el primer método el que se emplea en prácticamente todos los análisis actuales. Con relación a los aspectos metodológicos del radioinmunoanálisis de Hcrt-1 en LCR, la actual técnica de medición de éste neurotransmisor presenta una gran variabilidad interensayo que hace necesaria la inclusión de un grupo control y muestras de LCR con valores de referencia para obtener un resultado fiable (66).

Los niveles de Hcrt-1 en LCR son independientes de la edad, sexo, duración de la enfermedad, medicaciones psicotrópicas, tiempo de almacenaje y descongelaciones / congelaciones repetidas (30,32,67). No se han evidenciado gradientes de concentración en el LCR para la Hcrt-1 en sujetos normales (30,31). En experimentos realizados en perros se observó un incremento de más del 50% de los niveles basales de Hcrt-1 en LCR tras privación de sueño que se correlacionó con la actividad locomotora en las dos horas previas, sugiriendo una monitorización de estas variables previa a cualquier evaluación (47).

Los niveles de Hcrt-1 se correlacionan con la población neuronal hipocretinérgica en el hipotálamo de rata, con una reducción del 50% de los niveles en LCR implicando una reducción neuronal del 73% (68). Por tanto, sobre la base de estos estudios, se deduce que niveles normales de Hcrt-1 pueden no indicar una población

neuronal normal, ya que las neuronas supervivientes pueden compensar las deficitarias y mantener unos niveles normales. Por el contrario, los niveles indetectables en LCR indicarían una práctica ausencia de neuronas hipocretinérgicas.

La variación circadiana de la función del sistema hipocretina también puede ser observada en el LCR. En ratas, los niveles son mayores durante el periodo de actividad (periodo nocturno) y descienden un 40% al final del periodo de reposo (periodo diurno) (69). En primates con un ritmo de vigilia / sueño consolidado en un único episodio de sueño, los niveles de Hcrt-1 alcanzan un máximo en el último tercio del periodo de vigilia, y presentan su nivel más reducido cercano al momento del despertar tras el sueño nocturno, para empezar a incrementarse progresivamente desde este punto (70). En humanos se ha descrito una variación circadiana similar, presentando una oscilación de un 10 % a lo largo de un ciclo de 24 horas, con niveles máximos al final del periodo de vigilia y primeras horas del sueño (71), lo que sugiere que la hora del día en la que se extrae el LCR no influye decisivamente en los resultados.

El estado del sistema hipocretina / orexina ha sido evaluado en muchas enfermedades con y sin trastornos del ciclo sueño / vigilia a través del estudio de Hcrt-1 en LCR. Los pacientes con narcolepsia-cataplejía presentan característicamente unos niveles indetectables de Hcrt-1 (29-33), ya presente desde estadios iniciales de la enfermedad (72). La deficiencia de Hcrt-1 en LCR se asoció con una mayor asociación al HLA DQB1\*0602, un mayor número de SOREMs en el MSLT y una mayor frecuencia de cataplejía (32,73). Generalmente, los pacientes con narcolepsia y un HLA DQB1\*0602 negativo, algunos casos familiares de la enfermedad, y los pacientes con narcolepsia sin cataplejía e hipersomnia idiopática, tienen niveles normales. En un contexto clínico adecuado, la determinación de Hcrt-1 en LCR se considera como un

marcador biológico de narcolepsia con una especificidad del 99% y una sensibilidad del 87% para unos niveles menores de 110 pg/mL (32). Los niveles comprendidos entre 110 y 200 pg/mL se consideran intermedios y generalmente de significado clínico indeterminado, y los mayores de 200 pg/mL se consideran normales.

Adicionalmente a las hipersomnias centrales, el estado del sistema hipocretina se ha evaluado mediante los niveles en LCR de Hcrt-1 en diversas enfermedades. Niveles indetectables han sido encontrados, principalmente, en algunos pacientes con síndrome de Guillain-Barre (74) y encefalitis paraneoplásica anti-Ma2 (75). Niveles bajos han sido descritos en pacientes con el síndrome de Prader-Willi (32), el síndrome de Kleine-Levin durante la fase de somnolencia (33) y, en general, en afecciones del SNC con afectación del área hipotálamica posterior con o sin presencia de anomalías del ciclo sueño / vigilia (32). En algunos pacientes con traumatismo cerebral agudo se encontraron niveles indetectables o bajos en relación directa con la intensidad del trauma, presencia de lesiones cerebrales radiológicas, y el nivel de conciencia del paciente (76).





## **I.5.- NARCOLEPSIA Y AUTOINMUNIDAD**

La etiología de la narcolepsia permanece desconocida hoy en día. La narcolepsia es una de las enfermedades con mayor asociación al sistema HLA que se conocen, concretamente al HLA DQB1\*0602 (77,78). Este alelo se encuentra presente en más del 90% de pacientes narcolépticos con cataplejía, mientras que en la población normal caucásica está sólo en un 25% (78). Debido a la alta asociación a este sistema de moléculas implicadas en la presentación antigénica, se postula un probable origen autoinmune de la enfermedad, aunque hasta la fecha existen evidencias conflictivas al respecto. La pérdida selectiva de neuronas hipocretinérgicas en el hipotálamo de pacientes narcolépticos hace atractiva esta hipótesis, ya que este sistema, formado por un número relativamente pequeño de neuronas, podría ser vulnerable a un ataque autoinmune.

Las evidencias a favor de una etiología autoinmune en la narcolepsia son varias. Además de la asociación al HLA, otra característica, también encontrada en otras enfermedades autoinmunes, es una edad de inicio alrededor de la pubertad. Anticuerpos funcionales con hiperactividad colinérgica en suero de pacientes con narcolepsia han sido descritos recientemente en la narcolepsia (79). En este mismo estudio, 11 de 18 ratones inoculados con IgG de pacientes narcolépticos presentaron episodios transitorios de interrupción de su comportamiento que, aunque no se asociaron a disminución del tono muscular, se asemejaban a episodios de cataplejía. Se ha descrito reactividad del LCR de pacientes narcolépticos contra homogeneizado de hipotálamo de rata (80). En humanos, el tratamiento con inmunoglobulinas en pacientes al inicio de la enfermedad tiene un beneficio potencial sintomático, aunque el nivel de Hcrt-1 en LCR no se modificó en estos casos, por lo que este hallazgo podría ser inespecífico (81,82). El

incremento de gliosis descrito en algunos trabajos en el área hipotalámica perifornical (34,37) apoyaría un proceso inflamatorio local, aunque otros autores no han podido corroborar este dato (4). Analizando el patrón de degeneración axonal en cinco cerebros de pacientes narcolépticos se encontró una correlación con la distribución del Hcrtr2 en el SNC, lo que podría sugerir un proceso inmunológico contra este receptor o algún antígeno asociado (37). La encefalitis paraneoplásica anti-Ma2, una enfermedad autoinmune que produce hipersomnia y cataplejía como parte de su espectro clínico, se asocia a una deficiencia de hipocretina en LCR por probable daño hipotalámico (75,83), lo que podría sugerir una fisiopatología común con la narcolepsia.

Por el contrario, numerosos estudios evaluando diversos aspectos de autoinmunidad en narcolepsia han resultado negativos. La actividad de células T es normal en pacientes narcolépticos (84). Un reciente estudio ha evaluado la presencia de autoanticuerpos contra receptores del sistema hipocretina (85) así como contra la prehipocretina y sus moléculas derivadas (86), con resultados negativos. No obstante, queda abierta la posibilidad de no haber encontrado anticuerpos contra epítomos con modificaciones postranscripcionales por limitaciones metodológicas, así como la ausencia de detección de títulos de anticuerpos debido al largo tiempo de evolución de los pacientes. Estudios de inmunohistoquímica de suero y LCR de narcolépticos contra hipotálamo no reveló ningún marcaje específico (87). El LCR de narcolépticos no presenta bandas oligoclonales (88), y el suero carece de autoanticuerpos encontrados en otras enfermedades autoinmunes (89).

La hipótesis alternativa principal a la autoinmune, igualmente sin evidencias a favor, es la neurodegenerativa. En este sentido, la asociación al HLA podría jugar un

papel distinto a la autoinmunidad, favoreciendo una expresión clínica mayor y la aparición del sueño REM (90,91). No obstante, la falta de progresión clínica una vez instaurada la enfermedad, no apoyaría una fisiopatología neurodegenerativa aunque queda abierta la hipótesis de un proceso degenerativo transitorio inicial.



## **I.6.- TRASTORNOS DE LA VIGILIA Y EL SUEÑO EN OTRAS ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS**

### **I.6.1.- La enfermedad de Steinert**

La distrofia miotónica de Steinert tipo I (DMI) es una enfermedad multisistémica con herencia autonómica dominante caracterizada por miotonía, debilidad muscular, cataratas, alteraciones cardíacas, endocrinas y cognitivas. La enfermedad está causada por una expansión del triplete CTG en la región 3' del gen DMPK (*Dystrophia Myotonica Protein Kinase*) situado en el cromosoma 19q13.

Los pacientes con DMI presentan anormalidades del SNC tal como demuestran estudios de neuroimagen y anatomopatológicos (92-94), así como alteraciones del sistema hipotalámico-hipofisario (95). Es característico en esta enfermedad una elevada frecuencia de ESD de causa incierta, reportándose hasta en un 77% de casos, así como la presencia de signos de alteración de la regulación del sueño REM en el MSLT (96). En algunos pacientes, la presencia de ESD se ha asociado con una fragmentación del sueño debido a apneas del sueño o hipoventilación alveolar crónica (97,98). No obstante, el correcto tratamiento de estos problemas no siempre corrige la hipersomnia (99), sugiriendo que el origen de estas alteraciones es central. En este contexto, la DMI comparte con la narcolepsia la presencia de ESD y anormalidades de la regulación del sueño REM (96,100).

### **I.6.2.- Insomnio letal familiar**

El insomnio letal familiar (ILF) es una enfermedad neurodegenerativa rápidamente progresiva ligada a mutaciones del codón 178 de la proteína priónica. El polimorfismo en el codón 129 determina la expresión fenotípica en ILF o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ). Las manifestaciones clínicas del ILF consisten en alteraciones sensitivo-motoras, cognitivas en forma de déficits mnésicos, de atención, vigilancia y visuomotores, clínica disautonómica y alteraciones del ciclo de sueño / vigilia, con una pérdida progresiva del sueño y periodos breves de ESD con hiperactividad motora y pérdida del ritmo circadiano. Los pacientes también presentan alucinaciones complejas sugestivas de episodios oníricos que aparecen en los periodos de vigilia, así como entradas súbitas en sueño REM desde la vigilia (101). Electrofisiológicamente, los pacientes con ILF carecen de husos de sueño y complejos K, característicos de la fase II del sueño NREM.

Anatomopatológicamente, la enfermedad se caracteriza por una atrofia de los núcleos talámicos anteroventral y dorsomedial (102). El papel del tálamo en la regulación del ciclo sueño / vigilia no es bien conocido. El núcleo talámico dorsomedial tiene conexiones con el polo anterior del núcleo reticular talámico, siendo éste el principal origen de los husos de sueño (103). Las regiones anterior y dorsomedial talámicas reciben abundantes aferencias de las regiones cingulares y anterior del córtex, prosencéfalo e hipotálamo lateral. Los núcleos talámicos característicamente alterados en el ILF forman, por tanto, parte de un circuito funcional con el hipotálamo y sistema límbico implicado en la regulación del ciclo sueño / vigilia (104), por lo que su degeneración podría conducir a un desequilibrio funcional de dichos circuitos con la consiguiente manifestación clínica en forma de trastornos de la vigilia y el sueño (101).

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **II.1.- HIPÓTESIS**

**H.1.-** Los pacientes con hipersomnia central clasificados según la ICSD-2 en narcolepsia-cataplejía, narcolepsia sin cataplejía e hipersomnia idiopática presentan una asociación de determinados síntomas clínicos, electrofisiológicos y biológicos con los niveles de Hcrt-1 en LCR.

**H.2.-** La narcolepsia esta producida por un ataque autoinmune selectivo contra las neuronas hipocretinérgicas del hipotálamo, por lo que los pacientes narcolépticos deficientes en hipocretina presentan anticuerpos contra el hipotálamo.

**H.3.-** Los pacientes con distrofia miotónica tipo I y excesiva somnolencia diurna presentan una disfunción del sistema hipocretina que origina una alteración en la regulación del ciclo sueño / vigilia en analogía a la narcolepsia.

**H.4.-** Una disfunción del sistema hipocretina, un sistema con múltiples proyecciones a lo largo del SNC, entre ellas a los núcleos talámicos reticulares y paraventriculares, y con funciones implicadas en la regulación del ciclo sueño / vigilia y de la función autonómica, podría mediar parte de las manifestaciones clínicas de los trastornos de la vigilia y sueño presentes en el insomnio letal familiar.



## **II.2.- OBJETIVOS**

**O.1.-** Analizar la distribución de variables clínicas, electrofisiológicas y biológicas en una serie de pacientes con hipersomnia central clasificados en función de la ICSD-2, así como la posible relación de estas variables con los niveles de Hcrt-1 en LCR.

**O.2.-** Evaluación de la presencia de autoanticuerpos en suero y LCR de pacientes narcolépticos, previamente evaluados sobre la base de sus niveles de Hcrt-1 en LCR, por medio de técnicas de inmunohistoquímica y por el screening de una librería de expresión de ADN complementario de hipotálamo de rata, comparando los resultados obtenidos en el primer método con los de pacientes con encefalitis paraneoplásica anti-Ma2.

**O.3.-** Estudio del sistema hipocretina / orexina mediante la determinación de Hcrt-1 en LCR en pacientes con distrofia miotónica tipo I con excesiva somnolencia diurna evaluados clínica y electrofisiológicamente.

**O.4.-** Determinación de niveles de Hcrt-1 en LCR en pacientes con insomnio letal familiar como marcador biológico de la función hipotalámica hipocretinérgica, así como su comparación con los de pacientes con enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica, otra enfermedad priónica con menos alteraciones de la vigilia y el sueño en comparación con el insomnio letal familiar.

### **III. PACIENTES Y MÉTODOS**

#### **III.1.- Pacientes:**

Los pacientes con NC, NnC e IH fueron evaluados en el **trabajo 1 y 2** mediante una entrevista clínica analizando la presencia de síntomas y signos característicos de las hipersomnias centrales, un polisomnograma nocturno seguido de un MSLT, tipificación del HLA DQB1\*0602 y análisis de Hcrt-1 en LCR.

En el **trabajo 3** los pacientes con DMI se evaluaron clínica y electrofisiológicamente por medio de la realización de un polisomnograma nocturno seguido de un MSLT. Todos los pacientes fueron tipificados para el HLA DQB1\*0602. La repetición patológica del triplete CTG característico de la enfermedad fue estudiada en todos los pacientes. En aquellos casos en los que se apreciaron alteraciones respiratorias durante el sueño (índice de apnea / hipopnea > 10 / hora y desaturaciones de oxihemoglobina), los pacientes fueron tratados con BiPAP y, si fue requerido, oxigenoterapia domiciliaria.

En el **trabajo 4** se estudiaron pacientes con diagnóstico genético de ILF de forma clínica y mediante la determinación de niveles de Hcrt-1 en LCR, comparando los resultados con los obtenidos en pacientes con ECJ esporádica.

### **III.2.-Métodos:**

#### **- Determinación de Hcrt-1 en LCR.**

La determinación de Hcrt-1 en LCR se realizó mediante radioinmunoanálisis directo según el método publicado por Mignot et al (32), evaluando cada muestra por duplicado y utilizando controles internos con valores de referencia. Se realizaron al menos 2 determinaciones para cada paciente, siendo el resultado final la media de todas las determinaciones realizadas. Los niveles se clasificaron en intervalos previamente establecidos, considerados indetectables los valores menores de 40 pg/mL y bajos los menores de 110 pg/mL. Como valores control se usaron los obtenidos al determinar los niveles de Hcrt-1 en LCR en pacientes con enfermedades neurológicas con y sin hipersomnia.

#### **- Inmunohistoquímica:**

La técnica de inmunohistoquímica se basó en el método de avidina-biotina (105). Secciones seriadas de hipotálamo de rata congelado y fijado con paraformaldehído se incubaron con suero (dilución 1:100, 1:200, 1:500) o LCR (1:1). Secciones de hipotálamo adyacentes se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-hipocretina-2 para confirmar que el área en estudio era representativa del cúmulo hipocretinérgico.

#### **- Screening de una librería de expresión de ADN complementario de hipotálamo de rata:**

Los sueros provenientes de 5 pacientes representativos con narcolepsia-cataplejía deficientes en hipocretina fueron incluidos a una concentración de 1:1000 en el cribaje inmunológico de una librería ZAP-II lambda de hipotálamo de rata según el método descrito previamente (106). Se seleccionaron aquellos clones positivos y el ADN del plásmido fue posteriormente purificado y secuenciado.

## **IV. RESULTADOS**

### **IV.1.- TRABAJO 1:**

**Martínez-Rodríguez JE, Iranzo A, Casamitjana R, Graus F, Santamaria J. Análisis comparativo de un grupo de pacientes con narcolepsia-cataplejía, narcolepsia sin cataplejía e hipersomnia idiopática. Med Clin 2006 (en prensa).**

Se estudiaron un total de 51 pacientes (32 NC, 11 NnC y 8 HI). Los pacientes se clasificaron según un nivel de Hcrt-1 en LCR menor (n=34) o mayor (n=17) de 110 pg/mL. El 91% de pacientes NC tenían niveles indetectables de Hcrt-1 en LCR.

Las variables clínicas asociadas de forma significativa en pacientes con NC y NnC y en aquellos con niveles de Hcrt-1 bajos fueron la cataplejía, sueño nocturno fragmentado, conductas automáticas y siestas cortas reparadoras. La eficacia de sueño, el índice de despertares, el índice de movimientos periódicos durante el sueño en el polisomnograma nocturno, y la latencia media de sueño en el MSLT mostraron un gradiente entre NC, NnC e HI. La latencia media de SOREMs en el MSLT fue la única variable electrofisiológica con asociación significativa al clasificar los pacientes según la ICSD-2 y basándose en sus niveles de Hcrt-1. Entre las variables biológicas, el HLA DQB1\*0602 (NC en el 96,1%, NnC en el 67%, e HI en el 50%) y el índice de masa corporal presentaron un gradiente entre NC, NnC e HI..



## Análisis comparativo de un grupo de pacientes con narcolepsia-cataplejía, narcolepsia sin cataplejía e hipersomnias idiopáticas

José E. Martínez-Rodríguez<sup>a</sup>, Álex Iranzo<sup>a</sup>, Roser Casamitjana<sup>b</sup>, Francesc Graus<sup>a</sup> y Joan Santamaria<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Neurología. Hospital Clínic de Barcelona. Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Barcelona.

<sup>b</sup>Departamento de Bioquímica y Genética Molecular. Hospital Clínic de Barcelona. IDIBAPS. Barcelona. España.

**FUNDAMENTO Y OBJETIVO:** Analizar la distribución de variables clínicas, electrofisiológicas y biológicas, así como su relación con los valores de hipocretina 1 (Hcrt-1) en el líquido cefalorraquídeo (LCR), en pacientes con hipersomnias central diagnosticadas, según los criterios de la segunda revisión de la Internacional Classification of Sleep Disorders (ICSD-2), como narcolepsia-cataplejía (NC), narcolepsia sin cataplejía (NnC) e hipersomnias idiopáticas (IH).

**PACIENTES Y MÉTODO:** A todos los pacientes se les realizaron una entrevista clínica, un polisomnograma nocturno y un test de latencias múltiples de sueño, tipificación de antígenos de histocompatibilidad (HLA) y análisis de Hcrt-1 en el LCR (valores bajos  $\leq 110$  pg/ml).

**RESULTADOS:** De un total de 51 pacientes, se diagnosticó a 32 de NC, a 11 de NnC y a 8 de IH, y en 34 (66,7%) se encontraron valores bajos de Hcrt-1 (29 con NC, 3 con NnC y uno con IH). Entre los pacientes con NC, un 96,1% fueron positivos para HLA DQB1\*0602 y el 91% presentó valores bajos de Hcrt-1. Las variables más frecuentemente encontradas en pacientes con NC y en aquellos con valores bajos de Hcrt-1 fueron la cataplejía, el sueño nocturno fragmentado, siestas cortas reparadoras, conductas automáticas, el HLA DQB1\*0602 y, en el test de latencias múltiples de sueño, una latencia media de sueño reducida, un número mayor de episodios de sueño REM y una latencia media reducida de éstos. El tiempo de sueño nocturno prolongado o las dificultades en el despertar, 2 variables incorporadas a la ICSD-2 en el diagnóstico de IH, no diferenciaron los distintos grupos.

**CONCLUSIONES:** Las hipersomnias centrales presentan una superposición de diversas características clínicas, electrofisiológicas y biológicas que dificultan su diagnóstico diferencial. La determinación de Hcrt-1 en LCR puede facilitar el diagnóstico en casos con escasa definición clínica y/o electrofisiológica.

**Palabras clave:** Narcolepsia. Cataplejía. Hipersomnias idiopáticas. Hipocretina. Orexina. MSLT. SOREM.

Comparative analysis of patients with narcolepsy-cataplexy, narcolepsy without cataplexy and idiopathic hypersomnia

**OBJECTIVE:** To evaluate the distribution of clinical, electrophysiological and biological variables, and their relationship with the CSF hypocretin-1 levels, in patients with central hypersomnias diagnosed as narcolepsy-cataplexy (NC), narcolepsy without cataplexy (NnC) and idiopathic hypersomnia (IH) based on the ICSD-2 criteria.

**PATIENTS AND METHODS:** We performed in all patients a clinical interview, a nocturnal polysomnogram and a multiple sleep latency test (MSLT), HLA analysis and measurement of CSF Hcrt-1 levels (low  $\leq 110$  pg/mL).

**RESULTS:** 51 patients were classified as NC (32), NnC (11) and IH (8). 34 patients (66.7%) had low CSF Hcrt-1 levels (29 NC, 3 NnC and 1 IH). In the NC group, 96.1% were HLA DQB1\*0602 positive and 91% had low CSF Hcrt-1 levels. The most frequent variables found in NC patients and in those with a low CSF Hcrt-1 levels were cataplexy, fragmented nocturnal sleep, short refreshing naps, automatic behavior, HLA DQB1\*0602, and, in the MSLT, a short mean sleep latency, a higher number of REM sleep episodes and a short mean latency of REM sleep episodes. A long nocturnal sleep time and morning sleep drunkenness, two variables used in the ICSD-2 for the diagnosis of IH, were not different among the three groups of hypersomnias.

**CONCLUSION:** Central hypersomnias have a superposition of several clinical, electrophysiological and biological variables that makes sometimes difficult the differential diagnosis. The measurement of CSF Hcrt-1 levels may help in the diagnosis of those patients with unclear clinical or electrophysiological forms.

**Key words:** narcolepsy, cataplexy, idiopathic hypersomnia, hypocretin, orexin, MSLT, SOREM.

Correspondencia: Dr. J. Santamaria.

Servicio de Neurología. Hospital Clínic. Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Villarroel, 170. 08036 Barcelona. España.  
Correo electrónico: jsantama@clinic.ub.es

Recibido el 5-5-2006; aceptado para su publicación el 12-9-2006.

La narcolepsia-cataplejía es una enfermedad crónica, que se caracteriza por excesiva somnolencia diurna y manifestaciones clínicas derivadas de una alteración de la regulación del sueño de movimientos oculares rápidos o REM (*rapid eye movement*), siendo la cataplejía la manifestación más característica de esta entidad<sup>1</sup>. Electrofisiológicamente, los pacientes con narcolepsia presentan una latencia media de sueño reducida y varios inicios de sueño en REM (SOREM, de *sleep onset rapid eye movements*) en el test de latencias múltiples de sueño o MSLT (*multiple sleep latency test*). Cuando dicha combinación de características clínicas y electrofisiológicas está presente, el diagnóstico de narcolepsia-cataplejía no suele presentar dificultades<sup>2</sup>. Por otra parte, los casos de hipersomnias de origen central sin cataplejía que presentan SOREM en el MSLT se clasifican como narcolepsia sin cataplejía, y aquellos con hipersomnias de origen central sin cataplejía ni SOREM se clasifican como hipersomnias idiopáticas una vez excluido que sea secundaria a otras causas<sup>2</sup>. Sin embargo, las diferencias clínicas, electrofisiológicas y biológicas entre estas 3 entidades no son siempre evidentes, lo que dificulta en muchas ocasiones el diagnóstico diferencial. Mientras que la etiología de la hipersomnias idiopáticas es incierta, la narcolepsia-cataplejía se relaciona con anomalías del sistema hipotalámico hipocretinérgico (orexinérgico)<sup>3-5</sup> y presenta una asociación con el sistema de antígenos de histocompatibilidad (HLA), lo que invita a pensar en una probable etiología autoinmunitaria<sup>6-9</sup>. Recientemente, la clasificación internacional de los trastornos del sueño (Internacional Classification of Sleep Disorders, ICSD-2), en su segunda revisión, ha incluido la determinación de hipocretina 1 (Hcrt-1) en el líquido cefalorraquídeo (LCR) como una prueba adicional para el diagnóstico de narcolepsia, dada su alta sensibilidad y especificidad para esta entidad<sup>2,5</sup>. Diversos estudios previos han analizado los valores de Hcrt-1 en el LCR de pacientes con hipersomnias cen-

tra<sup>5,10,11</sup>. Sin embargo, hay pocos estudios que evalúen de forma conjunta y detallada aspectos clínicos, electrofisiológicos y biológicos de las 3 entidades principales<sup>12,13</sup>. El objetivo del presente estudio ha sido analizar, en una serie de pacientes de la población española diagnosticados de hipersomnia central de acuerdo con la ICSD-2, sus características clínicas, electrofisiológicas y biológicas, así como la posible relación de estas variables con los valores de Hcrt-1 en LCR.

## Pacientes y método

Durante el período comprendido entre enero de 2001 y abril de 2004, se evaluó consecutivamente a pacientes con hipersomnia central en la unidad multidisciplinaria de sueño del Hospital Clínic de Barcelona. A todos ellos se les realizaron una entrevista clínica detallada, escala de somnolencia de Epworth, medición del índice de masa corporal (IMC), estudio electrofisiológico completo, tipificación del HLA DQB1\*0602 y determinación de los valores de Hcrt-1 en LCR.

Los pacientes se clasificaron como narcolepsia-cataplejía (NC) cuando presentaban cataplejía, definida como pérdida del tono muscular, de aparición súbita y transitoria, relacionada con emociones y sin pérdida del conocimiento. A los pacientes sin cataplejía clara y cuya excesiva somnolencia diurna no estaba justificada por otras causas se les clasificó como narcolepsia sin cataplejía (NnC) o hipersomnia idiopática (HI) según presentaran en el MSLT 2 o más SOREM o menos de 2 SOREM, respectivamente<sup>2</sup>. Para su inclusión en el estudio, todos los pacientes tenían que presentar una somnolencia diurna excesiva de más de un año de duración y que no estuviera justificada por otras causas<sup>2</sup>, así como una latencia media de sueño en el MSLT menor de 8 min.

Aparte de la cataplejía, para el análisis estadístico se dicotomizó la presencia o ausencia de las siguientes variables clínicas de acuerdo con la entrevista clínica y la ICSD-2: a) parálisis de sueño; b) alucinaciones hipnagógicas o hipnopómpicas; c) sueño nocturno fragmentado; d) ataques súbitos e incoercibles de sueño a cualquier hora del día; e) episodios cortos de sueño reparador; f) conductas automáticas en relación con la excesiva somnolencia diurna; g) dificultades prolongadas en el despertar por la mañana (*sleep drunkenness*), y h) sueño nocturno prolongado (> 10 h). Las 2 últimas variables se destacan especialmente en la ICSD-2 para el diagnóstico de la HI. Se evaluó exhaustivamente la presencia de tratamientos concomitantes con efecto sobre el sistema nervioso central que pudieran tener efectos modificadores sobre la clínica y las pruebas electrofisiológicas, principalmente estimulantes del sistema nervioso central y fármacos antidepresivos.

El estudio electrofisiológico consistió en un polisomnograma nocturno (realizado entre las 23.00 y las 7.30 h), seguido de un MSLT<sup>14</sup> al día siguiente, realizándose 5 siestas de 20 min de duración a intervalos de 2 h. Las variables electrofisiológicas evaluadas fueron: a) eficacia de sueño (cociente entre el tiempo de sueño total y el tiempo total del registro, multiplicado por 100); b) índice de despertares (número de despertares por hora)<sup>15</sup>; c) índice de movimientos periódicos durante el sueño (número de PLM *-periodic leg movements-* por hora en el registro electromiográfico en los músculos tibiales anteriores)<sup>16</sup>; d) latencia media de inicio de sueño en el MSLT; e) número de episodios de SOREM en el MSLT, y f) latencia media de inicio de SOREM en el MSLT.

Tras consentimiento informado por escrito, se realizó a los pacientes una punción lumbar entre las 9.00 y las 11.00 h de la mañana, y se procedió a la conservación del LCR a -80 °C hasta la determinación de Hcrt-1 mediante radioinmunoanálisis directo usando controles internos de referencia según la técnica descrita previamente<sup>5</sup>. El análisis se repitió 2 o 3 veces en cada muestra para asegurar la fiabilidad de los resultados. Por lo que se refiere a los valores de Hcrt-1

en LCR, se consideraron situados por debajo del intervalo de detección de la técnica los menores de 40 pg/ml; bajos, los menores o iguales a 110 pg/ml; intermedios, los valores entre 110 y 200 pg/ml, y normales los mayores de 200 pg/ml<sup>5</sup>. Los valores de Hcrt-1 se compararon con los encontrados en otros pacientes con y sin hipersomnia utilizados como controles (encefalitis paraneoplásica anti-Ma2, 4 casos; lesiones hipotalámicas con hipersomnia, 3 casos; síndrome de Guillain-Barré, 3 casos; demencia con cuerpos de Lewy, 2 casos; hidrocefalia normotensiva, 2 casos; manía, un caso; fibromialgia, un caso; hipersomnia subjetiva no objetivada, un caso).

## Análisis estadístico

Para las variables no paramétricas se utilizaron la prueba de la  $\chi^2$ , el test exacto de Fischer y el test de la U de Mann-Whitney. Para las variables paramétricas se usó el test de la t de Student. Se estableció un valor de p inferior a 0,05 como estadísticamente significativo. En primer lugar, se analizó la distribución en los 3 grupos diagnósticos según la ICSD-2 (NC, NnC, HI) de todas las variables clínicas, electrofisiológicas y biológicas. Posteriormente, se analizaron las mismas variables en los pacientes con valores bajos de Hcrt-1 en LCR asumiendo una hipótesis fisiopatología narcoléptica. El número reducido de pacientes en los grupos de NnC e HI no permitió un análisis estadístico para alguna de las variables estudiadas (tabla 1).

El presente estudio fue aprobado por el Comité Ético local de nuestra institución.

## Resultados

Se evaluó a un total de 51 pacientes –35 varones y 16 mujeres–, con una edad media (desviación estándar) de 41,6 (16,5) años (extremos: 15-70). En la tabla 1 se muestran las características clínicas, electrofisiológicas y biológicas de los pacientes clasificados según la ICSD-2 en NC (n = 32), NnC (n = 11) e HI (n = 8). En la tabla 2 se presentan las mismas variables distribuidas entre los pacientes clasificados según el valor de Hcrt-1 en LCR fuera menor (n = 34) o mayor (n = 17) de 110 pg/ml. En el momento de la evaluación, en el grupo de NC, un paciente recibía tratamiento con fármacos estimulantes, otros 2 con antidepresivos y 5 con ambos; en el grupo de NnC, uno recibía tratamiento estimulante, otros con antidepresivos y un tercero con ambos, y en el grupo de HI, 2 recibían antidepresivos y uno estimulantes y antidepresivos. La presencia o ausencia de estos tratamientos no modificó los resultados del análisis estadístico de las variables evaluadas.

## Variables clínicas

Los pacientes clasificados como NC refirieron significativamente más sueño nocturno fragmentado y episodios cortos de sueño reparador que los pacientes con NnC, así como más alucinaciones, sueño nocturno fragmentado y conductas automáticas que los pacientes con HI (tabla 1). Asimismo, la presencia de alucinaciones, sueño nocturno fragmentado, ataques de sueño y conductas automáticas mostró un gradiente de mayor a menor entre NC, NnC e HI. Los pacientes con

valores bajos de Hcrt-1 tenían con más frecuencia cataplejía, sueño nocturno fragmentado, siestas cortas reparadoras y conductas automáticas que aquéllos con valores mayores de 110 pg/ml. No se encontraron diferencias significativas para otras variables clínicas, incluidos el tiempo de sueño nocturno prolongado (presente en 5 pacientes con HI) y dificultades en el despertar (tabla 2).

#### *Variables electrofisiológicas*

La eficacia de sueño y el índice de despertares mostraron un gradiente entre NC, NnC e HI. El índice de PLM mostró una tendencia a ser mayor en la NC que en la NnC e HI. En el MSLT, la latencia media de sueño fue diferente entre NC e HI –media de 2,05 (1,95) frente a 3,7 (1,65) min;  $p = 0,006$ –, con un gradiente de menor a mayor entre NC, NnC e HI. El número de SOREM fue similar en NC y NnC, pero su latencia media fue más corta en NC que en NnC –media de 3,14 (2) frente a 7 (3,1) min;  $p = 0,001$ –. Los pacientes con valores bajos de Hcrt-1 en LCR presentaron un mayor índice de PLM, una menor latencia media de sueño y de SOREM, así como un número mayor de SOREM en el MSLT. La eficiencia de sueño fue baja y el índice de despertares fue mayor en el grupo con valores bajos de Hcrt-1, pero sin alcanzar la significación estadística.

#### *Variables biológicas*

Los valores de Hcrt-1 en LCR fueron significativamente diferentes entre los pacientes con NC (bajos en un 94%), NnC (bajos en un 27,7%) e HI (bajos en un 12%). Todos los pacientes con valores bajos de Hcrt-1 presentaron unos valores indetectables, excepto un paciente con NC y otro con HI. Los valores de Hcrt-1 en LCR en los pacientes con lesiones hipotalámicas e hipersomnia fueron de 129, 148 y 125 pg/ml. En los pacientes con encefalitis paraneoplásica anti-Ma2, los valores fueron de 51, 55, 103 y 188 pg/ml. El resto de pacientes analizados mostraron valores dentro del intervalo de normalidad: media de 288 (39) pg/ml. El IMC y la frecuencia del HLA DQB1\*0602 mostraron un gradiente descendente entre NC, NnC e HI, así como entre los pacientes clasificados como deficientes y no deficientes de Hcrt-1.

### **Discusión**

Mientras que la NC es un síndrome bien definido, la HI, un síndrome menos prevalente, se diagnostica tras la exclusión exhaustiva de otras causas de somnolencia diurna excesiva<sup>2</sup>. La NnC se encuentra a caballo entre la NC y la HI, lo que en muchas ocasiones dificulta su diag-

nóstico diferencial<sup>2,12,17-20</sup>. Aunque el MSLT es una de las herramientas más útiles en el proceso diagnóstico, su sensibilidad y especificidad limitan a menudo su valor, ya que los SOREM pueden aparecer en otros trastornos del sueño distintos de la narcolepsia o incluso en la población sana de forma inespecífica<sup>21-23</sup>. El presente estudio es el primero realizado tras la segunda revisión de la ICSD, lo que permite realizar ciertos comentarios acerca de ésta, sobre la base de un estudio completo de pacientes con hipersomnia central, y de las variables empleadas en dicha clasificación. No obstante, es importante resaltar que el número de pacientes incluidos en nuestro estudio no permitió efectuar un análisis estadístico multivariado, limitación que presenta la mayoría de estudios sobre el tema publicados hasta la fecha<sup>10-13</sup>.

Las diferencias clínicas más significativas entre la NC, NnC e HI fueron el sueño nocturno prolongado, los episodios cortos de sueño reparador y las conductas automáticas, hallazgo corroborado al reclasificar a los pacientes de acuerdo con el valor de Hcrt-1 en LCR, lo que apoyaría que estos síntomas, junto a la cataplejía, se asocian a una fisiopatología narcoléptica. Las alucinaciones y los ataques de sueño presentaron un gradiente entre las 3 entidades. Por el contrario, el sueño nocturno prolongado y la dificultad en el despertar, 2 variables clínicas recientemente incluidas en la ICSD-2 como características de la HI, no mostraron diferencias significativas. Estudios previos han descrito un IMC elevado en las personas narcolépticas<sup>24</sup>. En nuestro estudio, encontramos una tendencia a un IMC mayor en la NC que en la HI, y en pacientes con valores bajos de Hcrt-1 en comparación con aquéllos con valores altos. No obstante, hay que remarcar que el número reducido de pacientes no permitió efectuar un análisis estadístico estratificado por edad y sexo, 2 variables que pueden influir en el valor del IMC.

El polisomnograma nocturno no fue útil en el diagnóstico diferencial de estas 3 entidades. Dicha prueba tiene su mayor utilidad para descartar causas secundarias de somnolencia diurna excesiva, siendo la principal el síndrome de apneas durante el sueño. Algunos hallazgos que merecen mención fueron el hecho de que la eficacia del sueño y el índice de despertares mostraron un gradiente entre NC e HI, probablemente relacionado con la menor capacidad de los pacientes con narcolepsia de mantener un sueño nocturno ininterrumpido. En cuanto al índice de PLM, presentaba una tendencia a ser mayor en la NC que en la NnC e HI, así como una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con valores de Hcrt-1 bajos y aquéllos con valo-

res normales. Este hecho confirmaría la relación de la presentación de PLM con la fisiopatología de la narcolepsia. Sin embargo, la presencia de síntomas indicativos del síndrome de piernas inquietas, frecuentemente asociado a PLM, no se evaluó exhaustivamente en nuestros pacientes, aunque ninguno refirió de manera espontánea presentar manifestaciones clínicas indicativas de este síndrome. En cuanto al MSLT, la latencia media de los SOREM fue significativamente menor en la NC que en la NnC, lo que podría indicar que la presión diurna del sueño REM es más alta en la primera. Este hallazgo, que no se ha descrito en estudios previos, podría ser de utilidad para la diferenciación electrofisiológica de la NC y NnC. La latencia media de sueño, el número de SOREM y la latencia media de SOREM en el MSLT también fueron significativamente diferentes entre los pacientes con valores bajos y altos de Hcrt-1 en LCR.

El presente estudio es el primero que evalúa en la población española los valores de Hcrt-1 en un grupo de pacientes con hipersomnia central. Más del 90% del grupo de NC presentó un valor bajo de Hcrt-1 en LCR, hallazgo similar al comunicado en estudios previos en otras poblaciones<sup>5,10,13</sup>. Entre los pacientes con NnC, 3 tuvieron valores bajos de Hcrt-1 (27%); 2 de ellos no presentaban cataplejía y el tercero era un caso con dudosa cataplejía. Todos los pacientes con HI presentaron valores de Hcrt-1 detectables, independientemente de la presencia de tiempo de sueño prolongado y dificultades en el despertar. Uno paciente con HLA positivo diagnosticado de HI con sueño nocturno prolongado (> 10 h) y sin SOREM en el MSLT presentó valores de Hcrt-1 de 45 pg/ml, lo que lo sitúa en el intervalo narcoléptico. Esta paciente recibía tratamiento con antidepresivos en el momento de realizar el MSLT, por lo que, aunque resulta poco probable, no es posible descartar una inhibición del REM en el estudio electrofisiológico<sup>23</sup>, habiéndose clasificado como NnC en el caso de haber presentado SOREM en el MSLT. Otro paciente con HI y valores normales de Hcrt-1 era familiar de segundo grado de 2 hermanos narcolépticos, uno de ellos incluido en nuestro estudio y con un valor de Hcrt-1 en LCR indetectable, lo que apoyaría el hecho de que factores genéticos comunes contribuirían a una expresión fenotípica distinta en forma de NC e HI<sup>17,25</sup>.

La narcolepsia es una enfermedad que presenta una alta asociación al sistema HLA tipo II, un sistema complejo de moléculas implicadas en la presentación antigénica del sistema inmunitario<sup>8,9</sup>. En nuestro estudio, todos los pacientes con valores bajos de Hcrt-1 en LCR fueron

positivos para el HLA DQB1\*0602. Asimismo, se observó un gradiente de positividad de mayor a menor para el HLA, tanto entre NC, NnC e HI como entre los pacientes con valores de Hcrt-1 inferiores o superiores a 110 pg/ml.

En resumen, nuestro estudio muestra algunas características clínicas (sueño nocturno fragmentado, siestas cortas reparadoras y conductas automáticas), electrofisiológicas (latencia media de sueño, número de episodios de SOREM y su latencia en el MSLT) y biológicas (HLA DQB1\*0602 y valores de Hcrt-1 en LCR) de la NC que, aparte de la cataplejía, pueden ayudar en el proceso diagnóstico. Sin embargo, cuando se aplican los criterios convencionales, la distribución de gran parte de las variables clínicas, biológicas y electrofisiológicas se solapan entre sí formando un espectro continuo entre los 3 tipos de hipersomnias centrales. La entidad NC estaría situada en un polo del espectro como la mejor definida de todas, tanto clínica como biológicamente, y, por tanto, sería la más delimitada por los criterios diagnósticos. En el otro extremo se hallaría el síndrome de HI, formado por el conjunto de entidades que persisten después de la exclusión de causas conocidas y, por tanto, considero como un cajón de sastre. Entre estas 2 entidades se situaría la NnC, formada tanto por la suma de pacientes con una forma incompleta o poco expresiva de NC como por pacientes que presentan una fisiopatología de alteración de la regulación REM distinta de la ocurrida en la NC<sup>23</sup>. Será necesaria la realización de nuevos estudios clínicos y básicos en pacientes con hipersomnias centrales para reducir las diferencias y límites, hoy día poco definidos, de estas entidades.

#### Agradecimiento

Agradecemos a la Dra. Guadalupe Ercilla, del Servicio de Inmunología del Hospital Clínic, su colaboración en el análisis del HLA de los pacientes.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez-Rodríguez JE, Iranzo A, Santamaría J. Narcolepsia. *Med Clin (Barc)*. 2002;119:749-54.
2. American Academy of Sleep Medicine. ICSD-2, the International Classification of Sleep Disorders: diagnostic and coding manual. 2<sup>nd</sup> ed. Westchester: American Academy of Sleep Medicine; 2005. p. 293.
3. Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overem S, Charnay Y, et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med*. 2000;6:991-7.
4. Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramnathan L, Gulyani S, Aldrich M, et al. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*. 2000;27:469-74.
5. Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, Okun M, Nevinsmalova S, Overem S, et al. The role of cere-



- brospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol.* 2002;59:1553-62.
6. Mignot E, Tafti M, Dement WC, Grumet FC. Narcolepsy and immunity. *Adv Neuroimmunol.* 1995;5:23-7.
  7. Black JL III, Krahn LE, Pankratz VS, Silber M. Search for neuron-specific and nonneuron-specific antibodies in narcoleptic patients with and without HLA DQB1\*0602. *Sleep.* 2002;25:719-23.
  8. Honda Y, Asaka A, Tanaka Y, Juji T. Discrimination of narcolepsy by using genetic markers and HLA. *Sleep Res.* 1983;12:254.
  9. Lin L, Hungs M, Mignot E. Narcolepsy and the HLA region. *J Neuroimmunol.* 2001;117:9-20.
  10. Ebrahim IO, Sharief MK, De Lacy S, Semra YK, Howard RS, Kopelman MD, et al. Hypocretin (orexin) deficiency in narcolepsy and primary hypersomnia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74:127-30.
  11. Baumann CR, Khatami R, Werth E, Bassetti CL. Hypocretin (orexin) deficiency predicts severe objective excessive daytime sleepiness in narcolepsy with cataplexy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77:402-4.
  12. Sturzenegger C, Bassetti CL. The clinical spectrum of narcolepsy with cataplexy: a reappraisal. *J Sleep Res.* 2004;13:395-406.
  13. Dauvilliers Y, Baumann CR, Carlander B, Bischof M, Blatter T, Lecendreux M, et al. CSF hypocretin-1 levels in narcolepsy, Kleine-Levin syndrome, and other hypersomnias and neurological conditions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74:1667-73.
  14. Carskadon MA, Dement WC, Mitler MM, Roth T, Westbrook PR, Keenen S. Guidelines for the multiple sleep latency test (MSLT): a standard measure of sleepiness. *Sleep.* 1986;9:519-24.
  15. American Sleep Disorders Association. EEG arousals: scoring rules and examples: a preliminary report from the Sleep Disorders Atlas Task Force of the American Sleep Disorders Association. *Sleep.* 1992;15:173-84.
  16. Michaud M, Paquet J, Lavigne G, Desautels A, Montplaisir J. Sleep laboratory diagnosis of restless legs syndrome. *Eur Neurol.* 2002;42:108-13.
  17. Bassetti C, Aldrich MS. Idiopathic hypersomnia: a series of 42 patients. *Brain.* 1997;120:1423-35.
  18. Billiard M, Dauvilliers Y. Idiopathic hypersomnia. *Sleep Med Rev.* 2001;5:351-60.
  19. Aldrich MS. The clinical spectrum of narcolepsy and idiopathic hypersomnia. *Neurology.* 1996;46:393-401.
  20. Bruck D, Parkes JD. A comparison of idiopathic hypersomnia and narcolepsy-cataplexy using self report measures and sleep diary data. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996;60:576-8.
  21. Moscovitch A, Partinen M, Guilleminault C. The positive diagnosis of narcolepsy and narcolepsy's borderland. *Neurology.* 1993;43:55-60.
  22. Aldrich MS, Chervin RD, Malow BA. Value of the multiple sleep latency test (MSLT) for the diagnosis of narcolepsy. *Sleep.* 1997;20:620-9.
  23. Mignot E, Lin L, Finn L, Lopes C, Pluff K, Sundstrom ML, et al. Correlates of sleep-onset REM periods during the multiple sleep latency test in community adults. *Brain.* 2006;129:1609-23.
  24. Schuld A, Hebebrand J, Geller F, Pollmacher T. Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet.* 2000;355:1274-5.
  25. Dauvilliers Y, Blouin JL, Neidhart E, Carlander B, Eliaou JF, Antonarakis SE, et al. A narcolepsy susceptibility locus maps to a 5 Mb region of chromosome 21q. *Ann Neurol.* 2004;56:382-8.

TABLA 1

**Características clínicas, electrofisiológicas y biológicas de pacientes con narcolepsia-cataplejía (NC), narcolepsia sin cataplejía (NnC) e hipersomnía idiopática (HI), clasificados de acuerdo con la segunda revisión de la International Classification of Sleep Disorders**

	NC (n = 32)	NnC (n = 11)	HI (n = 8)	P		
				NC-NnC	NC-IH	NnC-IH
Edad (años)	41,69 (16,94)	35 (14,28)	50,4 (15,2)	0,25	0,1	0,037
Sexo (varón/mujer)	26/6	6/5	3/5			
Cataplejía	32 (100%)	0	0			
Parálisis de sueño	19 (59%)	2 (18%)	2 (25%)	0,067	0,12	
Alucinaciones	16 (50%)	3 (25%)	0	0,3	0,013*	
Sueño nocturno fragmentado	27 (84%)	5 (41%)	3 (37%)	0,018*	0,015*	
Ataques de sueño	24 (75%)	8 (73%)	4 (50%)	1	0,17	
Siestas cortas reparadoras	27 (84%)	5 (41%)	5 (62,5%)	0,018*	0,32	
Conductas automáticas	21 (66%)	3 (27%)	2 (25%)	0,07	0,05*	
Tiempo de sueño prolongado (h)	10 (6,31)	12,36 (6,34)	10 (6,3)	0,26	0,65	0,39
Dificultades en el despertar	7 (22%)	4 (36%)	1 (12,5%)	0,43	1	
Escala de Epworth	18,34 (3,4)	16,8 (4,34)	19 (1,3)	0,36	0,82	0,34
Eficiencia de sueño (%)	83,53 (8,93)	83,64 (16,67)	85,75 (7,2)	0,98	0,68	0,65
Índice de despertares	24,44 (17,56)	19,46 (8,69)	18 (6,4)	0,62	0,59	0,62
Índice de PLM	15,63 (21,56)	4,74 (11,83)	5,6 (9,75)	0,13	0,178	0,93
Latencia media de sueño (MSLT) (min)	2,05 (1,95)	2,38 (2,38)	3,7 (1,65)	0,97	0,006*	0,126
SOREM	3,32 (1,5)	3,27 (1,1)	0	0,96	< 0,001*	
Latencia media de SOREM (MSLT) (min)	3,14 (2,09)	7,01 (3,1)	-	0,001*		
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	29,4 (5,11)	27,96 (7,44)	25,6 (5,23)	0,48	0,07	0,45
HLA DQB1*0602	31 (96,9%)	6 (67%)	4 (50%)	0,011*	0,003*	0,66
Valor de Hcrt-1 en líquido cefalorraquídeo						
Indetectable	29 (91%)	3 (27%)	0	< 0,001*	< 0,001*	
Bajo (< 110 pg/ml)	30 (94%)	3 (27%)	1 (12,5%)	< 0,001*	< 0,001*	

Valores expresados media (desviación estándar) o número de pacientes (porcentaje). Hcrt-1: hipocretina 1; HLA: antígenos de histocompatibilidad; MSLT: test de latencias múltiples de sueño; PLM: movimientos periódicos durante el sueño; SOREM: inicio de sueño en REM. \*Valores estadísticamente significativos

TABLA 2

**Características clínicas, electrofisiológicas y biológicas entre pacientes con hipersomnias centrales, clasificados de acuerdo con los valores de hipocretina 1 (Hcrt-1) en el líquido cefalorraquídeo**

	Hcrt-1 < 110 pg/ml (n = 34)	Hcrt-1 > 110 pg/ml (n = 17)	p
Edad (años)	40,79 (17,11)	43,24 (15,6)	0,62
Sexo (varón/mujer)	24/10	11/6	
Cataplejía	30 (88%)	2 (11,76%)	< 0,001*
Parálisis de sueño	17 (50%)	6 (35,3%)	0,37
Alucinaciones	15 (44%)	4 (23,53%)	0,22
Sueño nocturno fragmentado	29 (85%)	6 (35,3%)	0,001*
Ataques de sueño	26 (76%)	10 (58,82%)	0,33
Siestas cortas reparadoras	28 (82%)	9 (52,94%)	0,045*
Conductas automáticas	22 (65%)	4 (23,53%)	0,007*
Tiempo de sueño prolongado (h)	9,41 (5,72)	12,76 (5,6)	0,065
Dificultades en el despertar	6 (18%)	6 (35,29%)	0,29
Escala de Epworth	18,42 (3,34)	17,59 (3,5)	0,38
Eficiencia de sueño (%)	82,03 (10,85)	87,65 (9,4)	0,057
Índice de despertares	24,49 (17,23)	18,1 (6,7)	0,31
Índice de PLM	14,86 (21,22)	5,35 (10,85)	0,041*
Latencia media de sueño (MSLT) (min)	1,87 (1,84)	3,41 (2,13)	0,01*
SOREM	3,3 (1,43)	1,76 (1,9)	0,007*
Latencia media de SOREM (MSLT) (min)	3,56 (2,54)	6,38 (3,29)	0,014*
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	29,52 (5,2)	26,44 (6,38)	0,07
HLA DQB1*0602	34 (100%)	8 (47%)	< 0,001*

Valores expresados media (desviación estándar) o número de pacientes (porcentaje). HLA: antígenos de histocompatibilidad; MSLT: test de latencias múltiples de sueño; PLM: movimientos periódicos durante el sueño; SOREM: inicio de sueño en REM. \*Valores estadísticamente significativos.



## **IV.2.-TRABAJO 2:**

**Martínez-Rodríguez JE, Sabater L, Graus F, Iranzo A, Santamaria J.  
Evaluation of hypothalamic-specific autoimmunity in narcolepsy. Sleep  
2006 (in press).**

Se evaluaron el suero y LCR de un total de 26 pacientes con narcolepsia-cataplejía (25 HLA positivos, 24 deficientes en hipocretina, con un tiempo medio de evolución de la enfermedad de 22,35 años, DE 14,45) y 5 pacientes con narcolepsia sin cataplejía (2 HLA positivos; un paciente deficiente en hipocretina, tiempo medio de evolución 11,8 años, DE 5,32). No se encontró ninguna reactividad en el suero o LCR de pacientes con narcolepsia por técnicas de inmunohistoquímica (Figura 4). Este resultado contrastó con el obtenido en la evaluación de las muestras de 4 pacientes con encefalitis anti-Ma2 (4 sueros y 1 LCR; 2 pacientes con niveles bajos de Hcr-1, uno intermedio y otro normal), las cuales presentaron una reactividad débil y difusa contra el núcleo de neuronas hipotalámicas (Figura 5).

El screening de la librería hipotalámica identificó 4 clones reactivos que codificaron para 3 proteínas: la isoforma B de la enzima 3-quinasa inositol 1,4,5-trifosfato, copine I y prosaposina (2 clones). Sin embargo, no se encontró ninguna reactividad común de los 5 sueros evaluados contra estas proteínas.

# Evaluation of Hypothalamic-Specific Autoimmunity in Patients With Narcolepsy

Jose E. Martínez-Rodríguez, MD; Lidia Sabater, MD; Francesc Graus, MD; Alex Iranzo, MD; Joan Santamaria, MD

Neurology Service, Hospital Clinic de Barcelona and Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

**Abstract:** An autoimmune-mediated mechanism is considered the most probable etiology for narcolepsy. However, this hypothesis remains unproven. Since narcolepsy is characterized by dysfunction of the hypothalamic hypocretinergic (orexinergic) system, we evaluated the presence of hypothalamic-specific antibodies in sera and CSF of 25 hypocretin-deficient and 6 non-deficient narcoleptic patients by immunohistochemistry and analyzing a screening of a rat cDNA expression hypothalamic library. There was no hypothalamic-specific reactivity in serum or CSF by immu-

nohistochemistry. The screening of the hypothalamic library detected some reactive clones but not a common reactivity. Our study did not find any evidence of hypothalamic-specific autoimmunity in narcolepsy.

**Keywords:** Narcolepsy, autoimmunity, hypothalamus, hypocretin, orexin.

**Citation:** Martínez-Rodríguez JE; Sabater L; Graus F et al. Evaluation of hypothalamic-specific autoimmunity in patients with narcolepsy. *SLEEP* 2007;30(1):XXX-XXX

## INTRODUCTION

AN AUTOIMMUNE ETIOLOGY IS HYPOTHETICALLY INVOLVED IN THE PHYSIOPATHOLOGY OF NARCOLEPSY, ALTHOUGH THERE IS CONFLICTING EVIDENCE.<sup>1-4</sup> This disorder is related to abnormalities in the hypothalamic hypocretin (orexin) system with a characteristic deficiency in CSF Hypocretin-1 (Hcrt-1) levels in narcoleptic patients.<sup>5</sup> The aim of our study was to investigate the presence of hypothalamic-specific antibodies in the serum and CSF of narcoleptic patients, previously tested for CSF Hcrt-1 status, by using immunohistochemistry and the screening of a hypothalamic cDNA expression library. The latter is a systematic and unbiased approach method widely used for the detection of onconeural antigens eliciting specific immune responses.

## METHODS

Patients were evaluated with a complete clinical assessment, a standard nocturnal polysomnographic study followed by a Mean Sleep Latency Test (MSLT), and HLA typing for the presence of DQB1\*0602. After written informed consent, a lumbar puncture was performed to determinate CSF Hcrt-1 levels using a direct RIA with internal controls for validation of the results as previously reported.<sup>5</sup> CSF Hcrt-1 levels lower than 110 pg/mL were considered low.<sup>5</sup> The study was approved by the ethics committee of our hospital.

## Immunohistochemistry

Serum and CSF immunoreactivity from 26 narcolepsy-cataplexy and 5 narcolepsy without cataplexy patients were analyzed by immunohistochemistry using an avidin-biotin technique as previously described.<sup>6</sup> Serial hypothalamic sections of 5  $\mu$ m ob-

tained from paraformaldehyde-fixed frozen of Wistar rats brain were incubated with serum or CSF for 3 hours at 37°C at different dilutions (1:100, 1:200, and 1:500 for serum, 1:1 for CSF). Sections were then incubated with biotinylated goat anti-human antibody and developed with the avidin-biotin immunoperoxidase technique. Adjacent hypothalamic sections were incubated with rabbit hypocretin-2 polyclonal antibody (Chemicon International) to confirm that the area studied was representative for the hypocretinergic neuron cumulus. Sera from 4 patients with anti-Ma2 antibody related paraneoplastic syndrome (2 with low CSF-Hcrt-1 levels, 1 with intermediate levels, and 1 with normal levels, none with cataplexy) were analyzed in the immunohistochemistry process as positive controls due to the known hypothalamic involvement of this syndrome.<sup>7</sup> CSF from one anti-Ma2 patient with hypersomnia and low CSF Hcrt-1 levels was also analyzed by immunohistochemistry.

## Screening of a Hypothalamic cDNA Expression Library

A lambda ZAP-II Library (Stratagene, La Jolla, CA) from rat hypothalamus was immunoscreened at optimal density with a pool of sera from 5 representative hypocretin-deficient narcoleptic patients with cataplexy (each diluted 1/1000) as previously reported.<sup>8</sup> Several rounds of antibody screening were performed to reach a yield of 100% positive plaques. Phage clones were subcloned in pBluescript plasmid using the in vivo phage rescue protocol (Stratagene). Plasmid DNA was purified with the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA) and sequenced with the ABI3100 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the ABI PRISM dRhodamine Terminator cycle sequencing kit. The BLAST program (National Center for Biotechnology Information; National Institutes of Health Bethesda, MD) was used to search for sequence homologies.

## RESULTS

### Reactivity of Narcoleptic Sera and CSF in Rat Hypothalamic Tissue

Narcolepsy-cataplexy patients (n = 26; 25 HLA positive, 24 low CSF Hcrt-1 levels) had a mean disease duration of 22.35  $\pm$  15.45 years (range 2-50 years). Narcolepsy without cataplexy patients (n = 5; 2 HLA positive, 1 low CSF Hcrt-1 levels) had a mean disease duration time of 11.8  $\pm$  5.32 years (range 4-18 years). No reactivity was found in any sera or CSF from narcoleptic patients

## Disclosure Statement

Drs. Martínez-Rodríguez, Sabater, Graus, Iranzo, and Santamaria have indicated no financial conflicts of interest.

Submitted for publication April 20, 2006

Accepted for publication September 19, 2006

Address correspondence to: Joan Santamaria, MD, Neurology Service and IDIBAPS, Villarroel 170, Barcelona, 08036 SPAIN; Tel: +34932275413; Fax: +34932275783; E-mail: jsantama@clinic.ub.es

in contrast with the finding of mild diffuse hypothalamic reactivity in the nuclei of neurones of the anti-Ma2 samples (3 sera and 1 CSF).

### Antigen Analysis

The screening of the hypothalamic library produced 4 reactive clones coding for 3 proteins: Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B isoform, copine I and prosaposin (2 clones). However, a common reactivity against these proteins from the 5 sera of the pool could not be found.

### DISCUSSION

The association of narcolepsy with the HLA type II, the disease onset in young adulthood, and the anecdotal description of clinical improvement with immunotherapy at early stages suggest an autoimmune etiology. The hypocretinergic neurons are selectively reduced in the posterior hypothalamus of narcoleptic patients, so the hypocretin system might be a possible target of an autoimmune attack. It is a common finding in autoimmune diseases that the autoimmune attack is not primarily directed against the specific deficient protein of the disorder. Instead, the main target might be other non-identified proteins of the primary organs. Supporting this finding in narcolepsy, previous studies have showed no antibodies for preprohypocretin and its derivatives.<sup>3</sup>

We evaluated the presence of antibodies against the posterior hypothalamus in the serum and CSF from narcoleptic patients. However, we could not find any reactivity against the hypothalamus by immunohistochemistry nor could common target antigens be identified using a hypothalamic expression library. This result contrasts with a recent report of CSF IgG binding to rat hypothalamic tissue homogenate evaluated by enzyme linked immunosorbent assay.<sup>4</sup> Our negative result does not completely exclude the presence of autoantibodies since a limitation of the serological screening of cDNA expression libraries is the recognition of proteins that undergo posttranslational modifications, conformational epitopes, and multimeric proteins.<sup>8</sup> The long time delay after clinical onset makes possible that an antibody level in the sera and CSF could have decreased to a range undetectable by conventional immunohistochemistry, as occurs in other autoimmune diseases.<sup>4</sup> However, although low antibody levels may also limit their detection by the screening of cDNA expression library, this method has a higher sensitivity for detecting specific antibodies against linear epitopes than immunohistochemistry or ELISA.<sup>8</sup> Although the proteins identified in the screening have important functions in synaptic plasticity and in the lipid storage process that is probably altered in Niemann-Pick type C disease<sup>9</sup> (a disorder that shares with narcolepsy the presence of cataplexy), the unsuccessful attempt to define these antigens as targets in the final process of the screening does not allow us to relate them with the physiopathology of narcolepsy.

An alternative hypothesis to explain this negative result is an heterogeneous autoimmune response that limited the detection of a common reactivity, as occurs in other autoimmune disorders such as opsoclonus-myoclonus,<sup>8</sup> although this physiopathology would be less plausible in narcolepsy due to the common clinical phenotype and biological characteristics (HLA and hypocretin deficiency). The lack of positive results in the search for specific autoantibodies is also observed in some paraneoplastic disorders in which more sophisticated techniques might allow the detection

of antibody titles.<sup>6,10</sup>

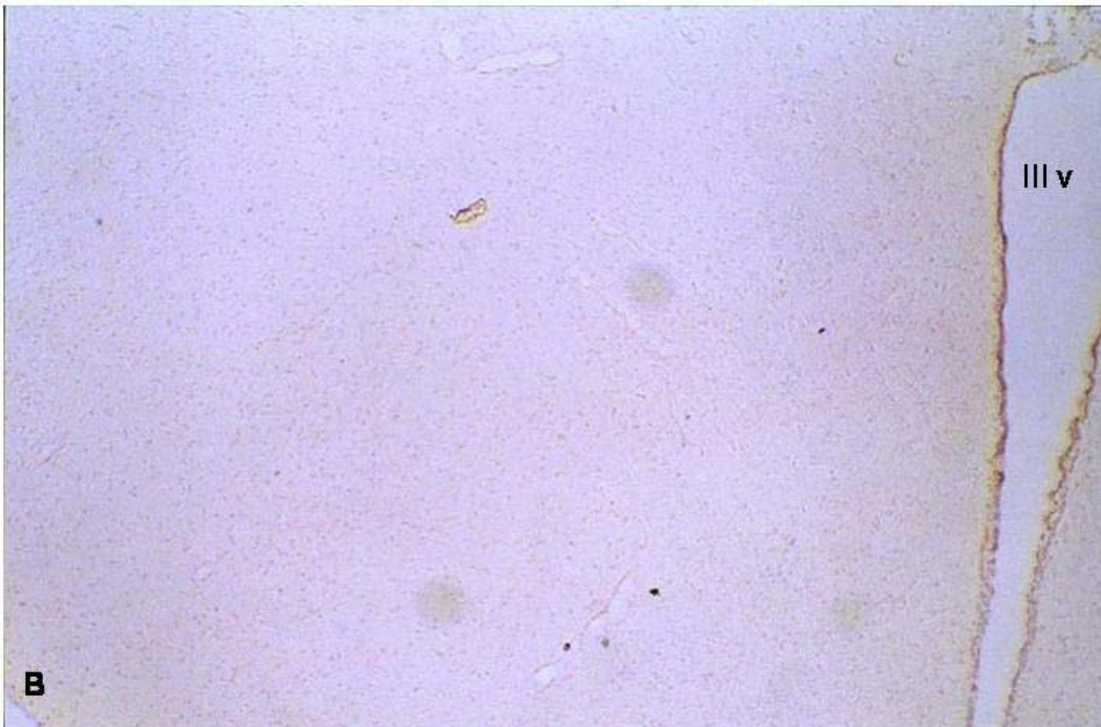
In summary, an hypothalamic-specific autoimmune hypothesis in narcolepsy, although not excluded, is not supported by our study.

### REFERENCES

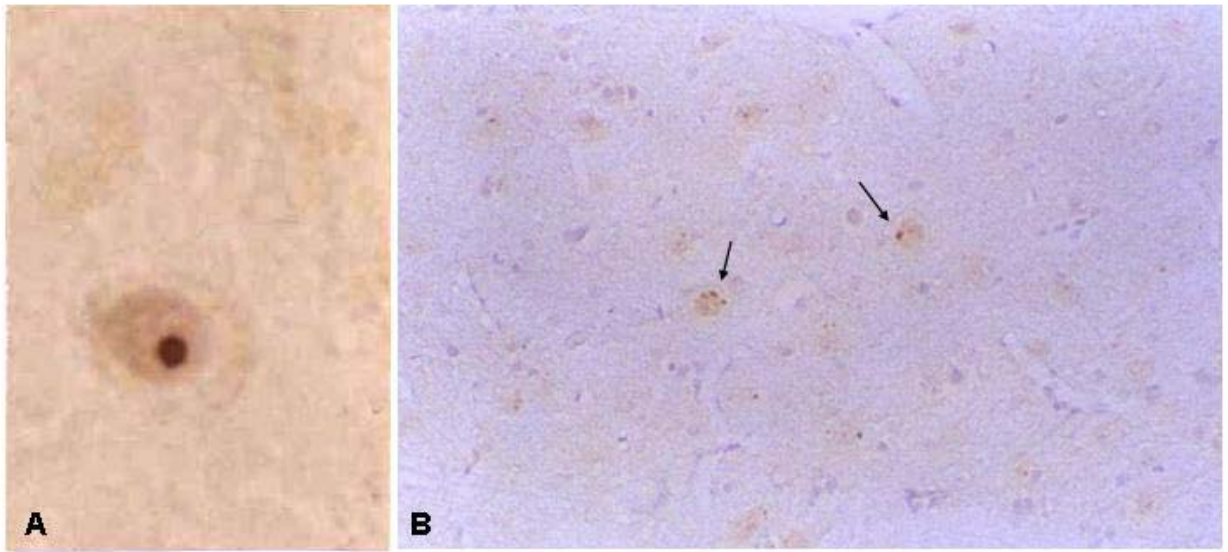
1. Tanaka S, Honda Y, Inoue Y, Honda M. Detection of autoantibodies against hypocretin, *hcrtr1*, and *hcrtr2* in narcolepsy: anti-Hert system antibody in narcolepsy. *Sleep* 2006;29:633-8.
2. Smith A, Jackson M, Neufing P, McEvoy R, Gordon T. A functional autoantibody in narcolepsy. *Lancet* 2004;364:2122-4.
3. Black JL 3rd, Silber MH, Krahn LE, et al. Analysis of hypocretin (orexin) antibodies in patients with narcolepsy. *Sleep* 2005;28:427-31.
4. Black JL 3rd, Avula RK, Walker DL, et al. HLA DQB1\*0602 positive narcoleptic subjects with cataplexy have CSF IgG reactive to rat hypothalamic protein extract. *Sleep* 2005;28:1191-2.
5. Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, et al. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol* 2002;59:1553-62.
6. Graus F, Dalmau J, Valldeoriola F, et al. Immunological characterization of a neuronal antibody (anti-Tr) associated with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *J Neuroimmunol* 1997;74:55-61.
7. Dalmau J, Graus F, Villarejo A, et al. Clinical analysis of anti-Ma2-associated encephalitis. *Brain* 2004;127:1831-44.
8. Bataller L, Rosenfeld MR, Graus F, Vilchez JJ, Cheung NK, Dalmau J. Autoantigen diversity in the opsoclonus-myoclonus syndrome. *Ann Neurol* 2003;53:347-53.
9. Bradova V, Smid F, Ulrich-Bott B, Roggendorf W, Paton BC, Harzer K. Prosaposin deficiency: further characterization of the sphingolipid activator protein-deficient sibs. Multiple glycolipid elevations (including lactosylceramidosis), partial enzyme deficiencies and ultrastructure of the skin in this generalized sphingolipid storage disease. *Hum Genet* 1993;92:143-52.
10. Ances BM, Vitaliani R, Taylor RA, et al. Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. *Brain* 2005;128:1764-77.

**Figura 4.** Inmunohistoquímica de hipotálamo de rata con anti-hipocretina-2 donde se observa un cúmulo de neuronas hipocretinérgicas (A). Secciones contiguas a (A) procesadas con suero (B) y LCR (C) de un paciente con narcolepsia-cataplejía con ausencia de marcaje neuronal.









**Figura 5.** **A)** Inmunohistoquímica de cerebro de rata mostrando el patrón característico de marcaje nuclear de los anticuerpos anti-Ma2. **B)** Inmunohistoquímica con anti-Ma2 en hipotálamo de rata. Se observa un marcaje débil y difuso de núcleos neuronales (flechas).

### **IV.3.- TRABAJO 3:**

**Martínez-Rodríguez JE, Lin L, Iranzo A, Genis D, Martí MJ, Santamaria J, Mignot E. Decreased hypocretin-1 (orexin-A) levels in the cerebrospinal fluid of patients with myotonic dystrophy and excessive daytime sleepiness. Sleep 2003; 26: 287-290.**

Se estudiaron un total de 6 pacientes, 5 hombres y una mujer, con una edad media de 42,5 años (DE 7,3) y un tiempo de evolución de 17,3 años (DE 2,8). Dos pacientes desarrollaron ESD varios años antes del inicio de la clínica motora. Tres pacientes recibían tratamiento con BiPAP para la corrección de las alteraciones respiratorias, dos de ellos precisando tratamiento con oxigenoterapia de forma adicional, sin que ninguna de estas medidas mejorara la ESD.

Todos los pacientes fueron negativos para el HLA DQB1\*0602. La latencia media de sueño en el MSLT fue anormal en todos los casos (<5 minutos en 2, ≤8 en 4) confirmando la presencia clínica de ESD. Dos pacientes presentaron 2 SOREMs en el MSLT. Los niveles de Hcrt-1 en LCR se hallaron significativamente reducidos en pacientes en comparación con los obtenidos en 13 controles (181 pg/mL, DE: 49 vs. 340 pg/ml DE: 15,  $p < 0,001$ ), siendo clasificados como bajos (<110 pg/mL) en un paciente, intermedios (110-200 pg/mL) en 3 pacientes, y normales (>200 pg/mL) en 2 pacientes. Ningún paciente presentó niveles indetectables de Hcrt-1. No se observó ninguna correlación con la presentación clínica, el estudio electrofisiológico o el tamaño de la repetición CTG.

# Decreased Hypocretin-1 (Orexin-A) Levels in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Myotonic Dystrophy and Excessive Daytime Sleepiness

Jose E. Martínez-Rodríguez, MD<sup>1</sup>; Ling Lin, MD<sup>2</sup>; Alex Iranzo, MD<sup>1</sup>; David Genis, MD<sup>3</sup>; Maria J. Martí, MD<sup>1</sup>; Joan Santamaria, MD<sup>1</sup>; Emmanuel Mignot, MD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Neurology service, Hospital Clínic i Provincial de Barcelona and Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain;

<sup>2</sup>Stanford Center for Narcolepsy, Stanford University Medical Center, Department of Psychiatry & Behavioral Sciences, Palo Alto, CA, USA; <sup>3</sup>Neurology Section, Hospital Universitari Doctor Josep Trueta, Girona, Spain

**Study Objectives:** Myotonic dystrophy type 1 is a multisystem disorder with myotonia, muscle weakness, cataracts, endocrine dysfunction, and intellectual impairment. This disorder is caused by a CTG triplet expansion in the 3' untranslated region of the DMPK gene on 19q13. Myotonic dystrophy type 1 is frequently associated with excessive daytime sleepiness, sharing with narcolepsy a short sleep latency and the presence of sleep-onset rapid eye movement periods during the Multiple Sleep Latency Test. Since narcolepsy is characterized by a dysfunction of the hypothalamic hypocretin system, we investigated whether patients with myotonic dystrophy type 1 with excessive daytime sleepiness have abnormalities in the hypocretin system.

**Design/Participants:** Six patients with myotonic dystrophy type 1 complaining of excessive daytime sleepiness and 13 healthy controls without a sleep disorder were included. The patients with myotonic dystrophy type 1 were evaluated using clinical interviews, nocturnal polysomnograms, and Multiple Sleep Latency Tests. All patients had a confirmed genetic diagnosis for DM1 and were HLA typed. Cerebrospinal fluid hypocretin-1 levels were measured using a direct radioimmunoassay in patients and controls.

**Setting:** University hospital sleep laboratory.

**Interventions:** N/A.

**Measurement and Results:** The mean sleep latency on Multiple Sleep Latency Tests was abnormal in all patients (<5 minutes in 2,  $\geq 5$  in 4) and 2 sleep-onset rapid eye movement periods were observed in 2 subjects. All patients were HLA-DQB1\*0602 negative. Hypocretin-1 levels were significantly lower in patients versus controls ( $p < 0.001$ ); 1 case with 2 sleep-onset rapid eye movement periods had hypocretin-1 levels in the range generally observed in narcolepsy (<110 pg/mL). Three cases had intermediate levels (110-200 pg/mL). Hypocretin-1 levels did not correlate clinically with disease severity or duration or with subjective or objective sleepiness reports.

**Conclusions:** A dysfunction of the hypothalamic hypocretin system may mediate sleepiness and abnormal Multiple Sleep Latency Test results in patients with myotonic dystrophy type 1.

**Key words:** Myotonic dystrophy; excessive daytime sleepiness; MSLT; SOREMP; hypocretin; orexin

**Citation:** Martínez-Rodríguez JE, Lin L, Iranzo A et al. Decreased Hypocretin-1 (Orexin-A) levels in the cerebrospinal fluid of patients with Myotonic Dystrophy and Excessive Daytime Sleepiness. *SLEEP* 2003;26(3):287-90.

## INTRODUCTION

MYOTONIC DYSTROPHY TYPE 1 (DM1, MIM160900), AN AUTOSOMAL DOMINANT DISORDER, is a progressive multisystem disease caused by the abnormal expansion of a CTG repeat (typically more than 50 repeats) in the 3' untranslated region of the DMPK gene on 19q13.<sup>1</sup> DM1 is one of the most common inherited neuromuscular diseases. Clinical characteristics include myotonia, muscle weakness, cataracts, frontal baldness, intellectual impairment, cardiac abnormalities, and endocrine disturbances such as testicular atrophy and insulin resistance. The constellation of variable symptoms is believed to be due to long-range molecular effects of the expansion on DMPK gene or a number of neighboring genes, such as the homeobox SIX5, and probably other mechanisms as well.<sup>2</sup> The size of the CTG repeat increases generation after generation and is correlated with severity and age of onset, providing a basis for genetic anticipation. The brain is affected, as documented by imaging and neuropathologic studies that have shown neuronal loss and neurofibrillary degeneration.<sup>3-9</sup> The disease is also

commonly associated with variable hypothalamic-pituitary abnormalities.<sup>10-12</sup>

Excessive daytime somnolence (EDS) is a common complaint in DM1.<sup>13-18</sup> In some patients, daytime sleepiness has been associated with sleep fragmentation secondary to sleep apnea or chronic alveolar hypoventilation.<sup>19-21</sup> However, adequate treatment of sleep-disordered breathing does not always eliminate the EDS.<sup>22,23</sup> Some authors have hypothesized that a central dysfunction is also probably involved.<sup>14,18,24</sup> Furthermore, DM1 shares some features with narcolepsy, such as severe EDS and the presence of sleep-onset rapid eye movement (REM) periods (SOREMP) in the multiple sleep latency test (MSLT),<sup>18,25</sup> and amphetamine-like stimulants and modafinil can be used successfully to treat this symptom.<sup>22,26</sup>

Narcolepsy has recently been associated with a dysfunction of the hypothalamic hypocretin (orexin) system.<sup>27</sup> Cerebrospinal fluid (CSF) levels of hypocretin-1 (Hcrt-1) are undetectable or low (<110 pg/mL) in almost 90% of narcoleptic patients with cataplexy, almost all with HLA-DQB1\*0602.<sup>28-30</sup> Neuropathologic studies in narcoleptic brains have shown severe and selective loss of the hypocretin neurons in the posterior hypothalamus.<sup>31,32</sup> In this study, we hypothesized that the EDS in DM1 results from hypothalamic damage to the hypocretin system. To test this hypothesis, CSF Hcrt-1 levels were measured in DM1 patients complaining of EDS and compared with normal control subjects' CSF Hcrt-1 levels. DM1 subjects were also evaluated polygraphically and using the MSLT.

## Disclosure Statement

Dr. Martínez-Rodríguez is a recipient of a postresidency grant from Hospital Clínic.

Submitted for publication November 2002

Accepted for publication February 2003

Address correspondence to: Jose E. Martínez Rodríguez, Neurology Service, Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, C/Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain; Fax: 3493-227-5783; E-mail: 33029jmr@comb.es

## METHODS

### Patients and Controls

Patients were 5 men and 1 woman (patient 4), mean age  $42.5 \pm 7.3$  years (range, 19-68 years), with a complaint of EDS and clinical symptoms of DM1. All patients had a molecular diagnosis of DM1<sup>1</sup>, as confirmed by the presence of CTG repeats longer or equal to 100 (Table 1). Patients were referred to the sleep center for evaluation of their EDS. Disease severity was evaluated by the Muscular Disability Rating Scale (MDSR).<sup>33</sup> Control samples were 8 males and 5 females without a sleep disorder and a mean age of  $39 \pm 4.5$  years (range, 22-69 years). The study was approved by the local Institutional Review Board.

### Evaluation of Daytime Sleepiness and Sleep-Disordered Breathing

Sleepiness was evaluated subjectively using the Epworth Sleepiness Scale (ESS)<sup>34</sup> and objectively using the MSLT. The MSLTs were performed following nocturnal polysomnography (PSG), and consisted of 5 naps at 9:30, 11:30, 13:30, 15:30, and 17:30.<sup>35</sup> In cases where significant sleep-disordered breathing was observed (apnea-hypopnea index greater than 10 and oxyhemoglobin desaturations), treatment with bilevel positive airway pressure (BiPAP) and oxygen therapy (if needed) was initiated. The PSG and MSLT studies were performed several months prior to lumbar puncture. The ESS scores were gathered the day of the lumbar puncture.

### CSF Assays and DQB1\*0602 Typing

The presence of HLA DQB1\*0602 was also determined using previously established polymerase chain reaction assays.<sup>30</sup> Lumbar puncture was performed in the morning and the CSF was immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Patients 1, 2, and 4 were compliant with BiPAP treatment when lumbar puncture was performed. The Hcrt-1 determination was performed using a direct radioimmunoassay with Hcrt-1 I<sup>25</sup>, as previously reported.<sup>29,30</sup> Three assays were conducted in duplicate in all controls and patients. Results were consistent in all 3 experiments, and the mean of all assays was reported as a single value for each subject. The CSF Hcrt-1 values in patients and controls were compared using *t*-tests.

## RESULTS

### Clinical Evaluation of DM1 Patients

Clinical, PSG, MSLT, and laboratory findings are summarized in Table 1. All patients were fully ambulatory, with a mean disease duration of  $17.3 \pm 2.8$  years. Two patients were obese (body mass index [BMI]  $>30$ ), and 1 patient was overweight (BMI=26.2). Severity, age, symptomatology, and disease duration represented a wide spectrum.

### Sleepiness in DM1 Patients

The mean ESS was  $13.3 \pm 6.6$ . In 4 patients, EDS started several years after the onset of muscle weakness and myotonia (range, 2-14 years), while in patients 1 and 4, sleepiness started 12 years and 20 years before, respectively. None of the patients had cataplexy, sleep paralysis, or hypnagogic hallucinations. Four patients (1, 2, 4, and 6) had significant sleep-disordered breathing. In patients 1, 2, and 4, a second PSG was performed to titrate BiPAP pressures and treat this symptom. These patients continued using BiPAP treatment. Patients 1 and 2 also required oxygen therapy. Patient 6 did not tolerate BiPAP and remained untreated for sleep-disordered breathing. After several months of ambulatory treatment, these patients reported that BiPAP did not resolve their sleepiness.

The nocturnal PSGs showed decreased REM sleep latency in 2 patients (3 and 55 minutes). The MSLTs demonstrated decreased sleep latency in all the patients, with a mean of  $5.5 \pm 3.9$  minutes (range, 1 minute 50 seconds-8 minutes) and the presence of 2 SOREMPs in 2 subjects.

### CSF Hcrt-1 and HLA Typing

None of the subjects were HLA-DQB1\*0602 positive. The mean CSF Hcrt-1 levels were significantly decreased when compared to normal control values ( $181 \pm 49$  pg/mL versus  $340 \pm 15$  pg/mL, mean  $\pm$  SEM,  $p < 0.001$ ) (Figure 1). The CSF Hcrt-1 levels were in the narcolepsy range ( $<110$  pg/mL) in 1 subject (patient 1), in the intermediate range ( $110$ - $200$  pg/mL) in 3 subjects (patient 2, 3, and 6), and in the normal range ( $>200$  pg/mL) in 2 subjects.

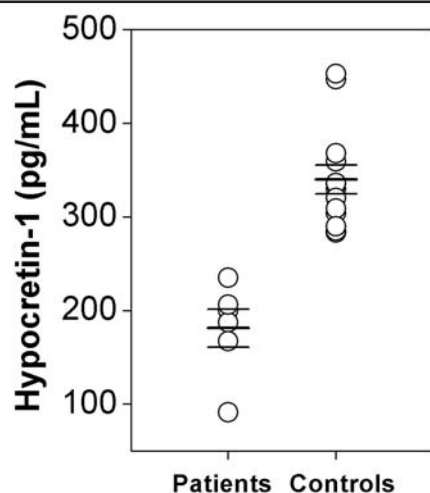
### Relationship Between CSF Hcrt-1 Levels and Clinical Symptomatology

Low CSF Hcrt-1 levels did not correlate clinically with disease symptomatology, severity, or duration or with the number of CTG repeat expansion. The 3 patients with the longest disease duration had low (patient 1), intermediate (patient 2), and normal (patient 4) Hcrt-1 levels. The Hcrt-1 levels also did not correlate clinically with disease severity, as evaluated using the MDSR. No obvious relationship with sleepiness, as reported subjectively using the ESS or objectively using the MSLT, was noted. Of the 2 patients with the most abnormal MSLT results, patients 1 and 4, 1 had Hcrt-1 levels in the narcolepsy range while the other was in the normal range.

**Table 1**—Clinical data from 6 Myotonic dystrophy patients

Patients	#1	#2	#3	#4	#5	#6
Age at evaluation (y)	46	47	19	50	25	68
Age at diagnosis (y)	26	28	3	30	12	52
Age of EDS onset (y)	14	42	5	10	14	55
CTG repeats (n)	667	667	500	150	1667	100
Main symptoms	HD,C,FB	CI,C,DM,FB	CI,FB	HD,C	HD,FB,CI	HD,CI,C,FB
MDSR	III	III	II	III	II	III
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	36.2	38.6	22.4	26.2	18	23.5
ESS (n)	10	8	16	21	5	20
AHI (n)	32	60	0	12	4	67
CT 90 (%)	99.7	19.3	0	16	0	16.6
PSG REM latency (min)	72	*	55	70	115	3
Mean sleep latency (min, sec)	4'45"	7'0"	8'0"	1'50"	5'40"	5'40"
SOREMP (n)	2	0	0	2	0	0
HLA DQB1*0602	-	-	-	-	-	-
Hcrt-1(pg/mL)	91	200	187	206	235	167

MDSR: Muscular Disability Rating Scale; I = minimal signs of impairment, II = distal weakness, III = moderate proximal weakness, IV = not ambulatory. HD: heart disease. C: cataract. DM: diabetes mellitus. CI: cognitive impairment. FB: frontal baldness. BMI: body mass index. ESS: Epworth Sleepiness Scale. SOREMP: sleep onset REM Periods. AHI: apnea-hypopnea index. CT 90: percentage of sleep time with oxyhemoglobin saturation below 90%. Hcrt-1: hypocretin 1. \* REM sleep was not observed in the PSG of this patient. -: negative for DQB1\*0602.



**Figure 1**—Cerebrospinal fluid hypocretin-1 levels in patients with myotonic dystrophy type 1 and controls. Bars denote mean  $\pm$  SEM.

## DISCUSSION

Our results indicate that CSF Hcrt-1 levels are decreased in patients with DM1 who complain of EDS. Although the number of patients studied is small, this finding suggests that the pathophysiology of EDS in some DM1 patients might be explained by a dysfunction of the hypothalamic hypocretin system. The decreased CSF Hcrt-1 levels did not correlate clinically with disease severity, suggesting it is unlikely to be related to nonspecific effects such as decreased locomotor activity, a parameter that has recently been linked with hypocretin activity in animals.<sup>36</sup> Importantly, however, decreased Hcrt-1 levels also did not correlate well with sleepiness severity.

Sleepiness is a common complaint in patients with DM1, with 39% to 77% of patients reporting this symptom.<sup>15,17,22</sup> Two main causes have been proposed to explain EDS in DM1: 1) respiratory disturbances and 2) an intrinsic dysfunction of sleep-wake mechanisms due to central nervous system impairment. Several respiratory disturbances during sleep have been described in myotonic dystrophy. Moderate to severe obstructive sleep apnea can be found in 10% to 75 % of DM1 patients,<sup>16,18,19,22</sup> although its presence is not clearly associated with EDS.<sup>18,22</sup> In addition, EDS is often present in patients without sleep-disordered breathing or when this symptom is adequately controlled using noninvasive ventilation and supplemental oxygen therapy, as found in the present study and others.<sup>22,23</sup> Chronic alveolar hypoventilation related to respiratory muscle weakness has also been proposed as a potential cause of EDS in DM1.<sup>20,21,37</sup> However, the EDS is not always related to the degree of muscular weakness,<sup>21,37</sup> and EDS may precede manifest muscular disease by many years,<sup>37</sup> as we found in 2 of our patients (patient 1 and 4). Another cause of chronic alveolar hypoventilation may be a dysfunction of the central respiratory control circuitry causing central apneas.<sup>7,19,22,24</sup>

The presence of complex sleep abnormalities in patients with DM1 also suggests a central mediation of EDS. Patients with DM1 have disrupted sleep-wake rhythmicity, with abnormally stable non-REM/REM-cycle duration across the night and no time-of-day effect on MSLT sleep latencies.<sup>14</sup> A hypothalamic alteration has been hypothesized to cause somnolence in DM1,<sup>18,24</sup> but this hypothesis has never been demonstrated, although there are reports showing endocrinologic dysfunctions of the hypothalamic-pituitary axis in DM1 patients.<sup>10-12</sup>

Our observation suggests a primary dysfunction of sleep-wake regulation in the central nervous system of DM1 patients independent of sleep-disturbed breathing. The degenerative process of DM1 is known to affect the central nervous system. Neuropathologic abnormalities, including neuronal loss, intracytoplasmic inclusion bodies, and neurofibrillary degeneration, have been reported in several brain areas such as the thalamus, cortex, and medullary autonomic respiratory center.<sup>3,4,6-9</sup> However, except for a single case report of neurofibrillary changes in the hypothalamus of a DM1 patient,<sup>6</sup> there are no detailed neuropathologic studies of this brain area in DM1.

In both DM1 and narcolepsy, sleepiness is associated with the presence of SOREMPs in the MSLT.<sup>18,25</sup> Two or more SOREMPs may be present in the MSLT in up to 4.7 % of patients with sleep apnea, and this finding correlates with oxyhemoglobin desaturations.<sup>38</sup> Since patients 1 and 4 had sleep-disordered breathing with oxyhemoglobin desaturations, we can not exclude this as the cause of the observed SOREMPs in at least these 2 cases. Other studies in DM1, however, have also shown SOREMPs without sleep-disordered breathing.<sup>18,25</sup>

In narcolepsy, a dysfunction of the hypocretin system probably underlies EDS and the REM sleep abnormalities such as cataplexy (<sup>27-30,39</sup>). Hypocretin-1 levels in CSF are undetectable in more than 90% of HLA-DQB1\*0602 positive narcoleptic patients with cataplexy,<sup>28-30</sup> and neuropathologic studies in narcoleptic brains show the absence or important reduction in the number of hypocretin neurons in the posterior hypothalamus.<sup>31,32</sup> Besides narcolepsy, low (<110 pg/mL) to intermediate CSF Hcrt-1 levels have also been detected in some hypersomnia patients without cataplexy, some patients with Guillain-Barré syndrome, and in patients with secondary narcolepsy, for example in association with

hypothalamic lesions or in Prader-Willi syndrome.<sup>30,40</sup> In addition, intermediate levels are also detected in some subjects with head trauma, encephalitis, and intracranial tumors.<sup>30</sup> Intermediate levels (110-200 pg/mL) are currently interpreted as a partial hypocretin deficiency.<sup>30</sup> We did not find any patient with undetectable hypocretin levels, as is usually reported in narcolepsy-cataplexy. In fact, 3 patients had intermediate levels, and 1 patient had low levels that were near the intermediate range. The finding that, unlike in narcolepsy, our DM1 patients were HLA DQB1\*0602 negative, suggests that the decrease of Hcrt-1 in these diseases might have different etiopathogenic mechanisms. In addition, it is also interesting to note that although our DM1 patients have decreased Hcrt-1 levels, they did not have cataplexy. It could thus be speculated that the development of cataplexy needs lower Hcrt-1 levels than those found in our DM1 patients. Neuropathologic studies of the hypocretin system in subjects with DM1 are needed to extend this observation. In addition, future studies including DM1 patients without EDS will be needed to support the hypothesis that hypocretin deficiency is not a non-specific aspect of DM1.

## REFERENCES

1. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992;68:799-808.
2. Sato S, Nakamura M, Cho DH, Tapscott SJ, Ozaki H, Kawakami K. Identification of transcriptional targets for Six5: implication for the pathogenesis of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 2002;11:1045-58.
3. Culebras A, Feldman RG, Meak FB. Cytoplasmic inclusion bodies within neurons of the thalamus in myotonic dystrophy. A light and electron microscopic study. *J Neurol Sci* 1973;19:319-9.
4. Ono S, Inoue K, Mannen T, Kanda F, Jinnai K, Takahashi K. Neuropathological changes in the brain in myotonic dystrophy: some new observations. *J Neurol Sci* 1987;81:301-20.
5. Glantz RH, Wright RB, Huckman MS, Garron DC, Siegel IM. Central nervous system magnetic resonance imaging findings in myotonic dystrophy. *Arch Neurol* 1988;45:36-7.
6. Yoshimura N, Otake M, Igarashi K, Matsunaga M, Takebe K, Kudo H. Topography of Alzheimer's neurofibrillary change distribution in myotonic dystrophy. *Clin Neuropathol* 1990;9:234-9.
7. Ono S, Takahashi K, Jinnai K, et al. Loss of catecholaminergic neurons in the medullary reticular formation in myotonic dystrophy. *Neurology* 1998;51:1121-4.
8. Sergeant N, Sablonnière B, Schraen-Maschke S, et al. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 2001;10:2143-55.
9. Seznec H, Agbulut O, Sergeant N, et al. Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum Mol Genet* 2001;10:2717-26.
10. Mahler C, Parizel G. Hypothalamic-pituitary function in myotonic dystrophy. *J Neurol* 1982;226:233-42.
11. Takase S, Okita N, Sakuma H, et al. Endocrinological abnormalities in myotonic dystrophy: consecutive studies of eight tolerance tests in 26 patients. *Tohoku J Exp Med* 1987;153:355-74.
12. Iwasaki Y, Oiso Y, Takatsuki K, et al. Impaired vasopressin secretion in patients with myotonic dystrophy. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 1988;64:69-77.
13. Manni R, Zucca C, Martinetti M, Ottolini A, Lanzi G, Tartara A. Hypersomnia in dystrophia myotonica: a neurophysiological and immunogenetic study. *Acta Neurol Scand* 1991;84:498-502.
14. van Hilten JJ, Kerkhof GA, van Dijk JG, Dunnewold R, Wintzen AR. Disruption of sleep-wake rhythmicity and daytime sleepiness in myotonic dystrophy. *J Neurol Sci* 1993;114:68-75.
15. Rubinsztein JS, Rubinsztein DC, Goodburn S, Holland AJ. Apathy and hypersomnia are common features of myotonic dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psych* 1998;64:510-5.
16. Giubilei F, Antonini G, Bastianello S, et al. Excessive daytime sleepiness in myotonic dystrophy. *J Neurol Sci* 1999;164:60-3.
17. Phillips MF, Steer HM, Soldan JR, Wiles CM, Harper PS. Daytime somnolence in myotonic dystrophy. *J Neurol* 1999;246:275-82.
18. Gibbs JW, Ciafaloni E, Radtke RA. Excessive daytime somnolence and increased rapid eye movement pressure in myotonic dystrophy. *Sleep* 2002;25:672-5.
19. Cirignotta F, Mondini S, Zucconi M, et al. Sleep-related breathing impairment in myotonic dystrophy. *J Neurol* 1987;235:80-5.
20. Finnimore AJ, Jackson RV, Morton A, Lynch E. Sleep hypoxia in myotonic dystrophy and its correlation with awake respiratory function. *Thorax* 1994;49:66-70.
21. Begin P, Mathieu J, Almirall J, Grassino A. Relationship between chronic hypercapnia and inspiratory-muscle weakness in myotonic dystrophy. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:133-9.
22. van der Meche FGA, Bogaard JM, van der Sluys JC, Schimsheimer RJ, Ververs CCM, Busch HFM. Daytime sleep in myotonic dystrophy is not caused by sleep apnea. *J Neurol Neurosurg Psych* 1994;57:626-8.
23. Guilleminault C, Philip P, Robinson A. Sleep and neuromuscular disease: bilevel positive airway pressure by nasal mask as a treatment for sleep disordered breathing in

- patients with neuromuscular disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:225-32.
24. Hansotia P, Frens D. Hypersomnia associated with alveolar hypoventilation in myotonic dystrophy. *Neurology* 1981;31:1336-7.
  25. Park YD, Radtke RA. Hypersomnolence in myotonic dystrophy: demonstration of sleep onset REM sleep. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;58:512-3.
  26. Damian MS, Gerlach BS, Schmidt F, Lehmann E, Reichmann H. Modafinil for excessive daytime sleepiness in myotonic dystrophy. *Neurology* 2001;56:794-6.
  27. Lin L, Faraco J, Li R, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 1998;365-76.
  28. Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GL, Mignot E. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 2000;355:39-40.
  29. Ripley B, Overeem S, Fujiki N, et al. CSF hypocretin/orexin levels in narcolepsy and other neurological conditions. *Neurology* 2001;57:2253-8.
  30. Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, et al. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol* 2002;59:1553-62.
  31. Peyron C, Faraco J, Rogers W, et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 2000;6:991-7.
  32. Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, et al. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 2000;27:469-74.
  33. Mathieu J, Braekeleer M, Prevost C, Boily C. Myotonic dystrophy: clinical assessment of muscular disability in an isolated population with presumed homogeneous mutation. *Neurology* 1992;42:203-8.
  34. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* 1991;14:540-5.
  35. Carskadon MA, Dement WC, Mitler MM, Roth T, Westbrook PR, Keenen S. Guidelines for the multiple sleep latency test (MSLT): a standard measure of sleepiness. *Sleep* 1986;9:519-24.
  36. Wu MF, John J, Maidment N, Lam HA, Siegel JM. Hypocretin release in normal and narcoleptic dogs after food and sleep deprivation, eating and movement. *Am J Physiol Regul Integr Physiol* 2002;283:R1079-86.
  37. Coccagna G, Mantovani M, Parchi C, Mironi F, Lugaresi E. Alveolar hypoventilation and hypersomnia in myotonic dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1975;38:977-84.
  38. Chervin RD, Aldrich MS. Sleep onset REM periods during multiple sleep latency tests in patients evaluated for sleep apnea. *Am J Respr Crit Care Med* 2000;161:426-31.
  39. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999;98:437-51.
  40. Scammell TE, Nishino S, Mignot E, Saper CB. Narcolepsy and low CSF orexin (hypocretin) concentration after a diencephalic stroke. *Neurology* 2001;56:1751-3.



#### **IV.4.- TRABAJO 4:**

**Martínez-Rodríguez JE, Sanchez-Valle R, Saiz A, Lin L, Iranzo A, Mignot E, Santamaria J. Normal hypocretin-1 levels in the cerebrospinal fluid of patients with fatal familial insomnia. Sleep 2003; 26: 1068.**

Se estudiaron 5 pacientes con diagnóstico genético de ILF (D178N-129M), 2 de ellos familiares. Los pacientes tenían una edad media de 54 años (DE 7,9), con un tiempo de evolución de la enfermedad en el momento del estudio comprendido entre 5 y 9 meses. Tres pacientes presentaban insomnio a la hora de la evaluación. El estudio anatomopatológico se realizó en 4 pacientes demostrando atrofia y gliosis de los núcleos talámicos anteroventrales y dorsomediales. Los niveles de Hcrt-1 se compararon con los de 4 pacientes con ECJ esporádica (edad media 65 años (DE 10.1), tiempo de evolución 1-3 meses, confirmación anatomopatológica en 3 casos) y con sujetos control. Los niveles de Hcrt-1 se encontraron dentro del rango de normalidad (>200 pg/mL) en todos los pacientes (274 pg/mL (DE 70) en los pacientes con ILF, 288 pg/mL (DE 288) en los pacientes con ECJ, 351 pg/mL (DE 13) en sujetos control).



## Normal Hypocretin-1 Levels in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Fatal Familial Insomnia

Jose E. Martínez-Rodríguez, MD<sup>1</sup>; Raquel Sanchez-Valle, MD<sup>1</sup>; Albert Saiz, MD<sup>1</sup>; Ling Lin, MD<sup>2</sup>; Alex Iranzo, MD<sup>1</sup>; Emmanuel Mignot, MD, PhD<sup>2</sup>; Joan Santamaria, MD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neurology Service, Institut d'investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, Barcelona, Spain;

<sup>2</sup>Stanford Center for Narcolepsy, Stanford University Medical Center, Palo Alto, Calif, USA

### DEAR EDITOR,

FATAL FAMILIAL INSOMNIA (FFI) IS AN INHERITED DISEASE LINKED TO MUTATIONS AT CODON 178 OF THE PRION PROTEIN GENE. A polymorphism on codon 129 determines the phenotypic expression into FFI versus familial Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). Clinical manifestations include cognitive impairment, dysautonomia and sleep disturbances, most typically a progressive loss of nocturnal sleep, brief episodes of daytime somnolence, and direct brief transitions from a state of subwakefulness into rapid eye movement sleep.<sup>1</sup> The pathologic hallmark of FFI is a neurodegeneration of the anteroventral and dorsomedial thalamic nuclei.<sup>2</sup> It has been hypothesized that the degeneration of these nuclei, which are part of functional circuits connected with the hypothalamus,<sup>3</sup> may lead to a functional disequilibrium that could explain sleep disturbances in FFI.<sup>1</sup>

The neuropeptide system hypocretin is involved in the regulation of sleep with unique interactions with sleep regulatory regions.<sup>4</sup> All hypocretin neurons are located in the posterior hypothalamus and project widely to the brain, including the reticular and paraventricular thalamic nuclei. In addition, the hypocretin system regulates not only sleep, but also the autonomic nervous system, so a hypocretin dysfunction, as part of a hypothalamic malfunction, might contribute to clinical abnormalities seen in FFI.

We measured hypocretin-1 levels in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with FFI as a functional biologic marker of the hypocretin system, and compared these hypocretin-1 levels in the CSF of patients with FFI with those from patients with sporadic CJD, another prion disease with thalamic involvement with less prominent sleep disturbances.

Five patients with definite FFI (D178N-129M), 3 unrelated, were evaluated between the fifth and ninth months after disease onset. Four subjects were methionine homozygous at codon 129. All patients were men, with a mean age of 54  $\pm$  7.9 years. Insomnia was present in 3 patients, and cognitive impairment in 2. The neuropathologic study was available in 4 patients and showed atrophy and gliosis of the anteroventral and dorsomedial thalamic nuclei. Four patients who met the clinical criteria for probable sporadic CJD (1 man, mean age: 65  $\pm$  10.1 years) were evaluated between 1 and 3 months after disease onset. All patients had myoclonus and periodic sharp-wave complexes in the electroencephalogram, suggesting reticular thalamic involvement.<sup>5</sup> The neuropathologic study confirmed the diagnosis of CJD in 3 cases. After lumbar puncture, the CSF samples were immediately stored at -80°C. Hypocretin-1 determination was performed using a direct radioimmunoassay as previously reported.<sup>4</sup> All CSF samples were evaluated in duplicate in the same assay, and standard samples were used as internal controls. The mean CSF hypocretin-1 value (mean  $\pm$  SEM) was 274  $\pm$  22.43 pg/mL (range, 248-306 pg/mL) in patients with FFI and 288  $\pm$  70 pg/mL (range, 206-375 pg/mL) in patients with sporadic CJD. All

patients had normal hypocretin-1 levels (control values, 351.48  $\pm$  13.01 pg/mL, all > 200 pg/mL).<sup>4</sup> The mean value of the hypocretin-1 levels in the patients with FFI was not different from that of patients with sporadic CJD, although the levels in the patients with sporadic CJD showed a slightly higher range of variability.

Our study, although small, does not support a hypocretinergic hyperfunction or hypofunction in patients with FFI that could explain the sleep disturbances seen in this disorder. In addition, we did not find any difference in the CSF hypocretin-1 levels between patients with FFI and sporadic CJD, 2 prionopathies with different sleep manifestations. Other mechanisms distinct from hypocretinergic neurotransmission may explain the altered sleep and vigilance states in FFI.

### REFERENCES

1. Sforza E, Montagna P, Tinuper P, et al. Sleep-wake cycle abnormalities in fatal familial insomnia. Evidence of the role of the thalamus in sleep regulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1995;94:398-405.
2. Manetto V, Medori R, Cortelli P, et al. Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases. *Neurology* 1992;42:312-9.
3. Velayos JL, Reinoso-Suarez F. Organization of projections from the reticular thalamic nucleus, hypothalamus and basal prosencephalon to the intralaminar and medial thalamic nuclei. In: *The Diencephalon and Sleep*. Mancina M, Marini G, eds. New York: Raven Press; 1990:249-61.
4. Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, et al. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol* 2002;59:1553-62.
5. Tschampa HJ, Herms JW, Schulz-Schaeffer WJ, et al. Clinical findings in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease correlate with thalamic pathology. *Brain* 2002;125:2558-66.

Address correspondence to: Jose E. Martínez-Rodríguez, MD, Neurology Service, Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, C/Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain; Tel: 3493-227-5414; Fax: 3493-227-5783; E-mail: 33029jmr@comb.es



## V.- DISCUSIÓN GENERAL

El diagnóstico diferencial de las hipersomnias centrales puede resultar difícil en determinados casos debido a la superposición clínica, electrofisiológica y biológica existente entre NC, NnC e HI. Aunque el MSLT es una de las herramientas diagnósticas más útiles, la presencia de SOREMs puede aparecer en otros trastornos del sueño distintos a la narcolepsia o incluso en la población normal de forma inespecífica (14,15). En el **trabajo 1**, al igual que en estudios previos, los pacientes evaluados con niveles bajos de Hcrt-1 en LCR fueron todos positivos para el HLA DQB1\*0602. Las diferencias clínicas más significativas encontradas entre estas tres entidades fueron el sueño nocturno fragmentado, las siestas reparadoras y las conductas automáticas, diferencias que se mantuvieron al reanalizar las variables en función de los niveles de Hcrt-1 en LCR, lo que podría indicar una mayor relación de estos síntomas con una fisiopatología derivada de una disfunción hipocretinérgica. Es interesante remarcar que el sueño nocturno prolongado y las dificultades en el despertar no permitieron realizar un diagnóstico diferencial entre las entidades, hecho que contrasta con la reciente importancia de estos síntomas en base a la nueva ICSD-2. Aparte de una latencia media de sueño reducida y la presencia de SOREMs en el MSLT, la medición de la latencia media de SOREMs fue una variable significativamente diferente entre NC y NnC, probablemente debido a una menor alteración de la regulación del sueño REM en la última.

En el **trabajo 2** se evaluó la presencia autoinmunidad hipotalámica-específica en pacientes narcolépticos con resultados negativos. Un hecho común en las enfermedades autoinmunes es un ataque inflamatorio no dirigido primariamente contra la proteína deficiente del sistema, sino contra otras proteínas, no siempre identificadas, en las

células deficitarias. La pérdida neuronal en la narcolepsia es muy selectiva, al igual que ocurre en otras enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus tipo I. Sin embargo, nuestro estudio no encontró ninguna reactividad hipotalámica por inmunohistoquímica en suero o LCR de pacientes narcolépticos. El tiempo de evolución prolongado de los pacientes pudo haber originado un título de anticuerpos indetectables por esta técnica. Esto mismo ocurre en la diabetes mellitus tipo I, en donde los anticuerpos contra los islotes pancreáticos descienden a títulos bajos transcurridos 5-10 años del inicio (107), y en la enfermedad de Addison (108). Así mismo, tampoco se obtuvo un resultado positivo en el screening de la librería hipotalámica de ADN complementario. La ausencia de reacción de los sueros estudiados contra las proteínas identificadas en el clonaje no permite relacionar ninguna de ellas con la fisiopatología de la narcolepsia. Sin embargo, este resultado negativo tampoco puede excluir la presencia de anticuerpos, ya que esta técnica no permite detectar anticuerpos contra epítopos conformacionales, aquellos que sufren modificaciones postranscripcionales ni anticuerpos contra proteínas multiméricas. De estar dirigido un hipotético anticuerpo en la narcolepsia contra alguno de estos epítopos, su detección no habría sido posible con la técnica utilizada.

En el **trabajo 3**, la reducción de los niveles de Hcrt-1 en LCR de los pacientes con DMI y ESD no se relacionó con la presencia de un fenotipo narcoléptico definido por la presentación clínica y electrofisiológica, ni tampoco con la severidad de la enfermedad o la actividad locomotora. La disfunción del sistema hipocretina, definida por la anormalidad de los niveles en LCR, podría sugerir que este sistema está implicado en la fisiopatología de los trastornos del sueño / vigilia de esta enfermedad. No obstante, la falta de correlación clínica y electrofisiológica, el número reducido de

pacientes estudiados y la falta de inclusión en el estudio de pacientes con DMI sin ESD, así como unos niveles de Hcrt-1 en LCR, aunque reducidos en comparación con controles, por encima del rango narcoléptico en 5 casos ( $>110$  pg/mL), un valor de difícil significación en la actualidad, no permite descartar que estos resultados sean inespecíficos en ausencia de estudios anatomopatológicos del área hipotalámica lateral en esta enfermedad.

Los resultados obtenidos en el estudio del sistema hipocretina en pacientes con ILF en el **trabajo 4**, aunque realizado con un número pequeño de pacientes, no mostraron ninguna hipofunción o hiperfunción de dicho sistema que permitan involucrarlo en la disfunción de la regulación central del ciclo sueño / vigilia. Tampoco se encontró ninguna alteración en pacientes con ECJ.



## **VI.- CONCLUSIONES**

**C.1.-** La narcolepsia-cataplejía, narcolepsia sin cataplejía e hipersomnia idiopática presentan un espectro continuo entre ellas de gran parte de variables clínicas, biológicas y electrofisiológicas que dificultan el diagnóstico diferencial al aplicar los criterios diagnósticos actuales. La determinación de Hcrt-1 en LCR en nuestra población de pacientes con hipersomnias centrales mostró unos resultados similares a estudios previos, pudiendo facilitar el diagnóstico diferencial en casos con escasa definición clínica y/o electrofisiológica.

**C.2.-** La hipótesis autoinmune en la narcolepsia, aunque no excluida, no se sustenta basándose en el estudio realizado.

**C.3.-** Las alteraciones de vigilia y sueño en los pacientes con distrofia miotónica tipo I podrían estar mediadas por una disfunción del sistema hipocretina. Son necesarios nuevos estudios para comprobar este hallazgo.

**C.4.-** Las alteraciones de vigilia y sueño en los pacientes con insomnio letal familiar no se justifican por una disfunción del sistema hipocretina.





## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

- 1 Kavanau JL. Evolutionary approaches to understanding sleep. *Sleep Med Rev* 2005; 9: 141-152.
- 2 Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. *Science* 1953; 118: 273-274.
- 3 Mignot E, Taheri S, Nishino S. Sleeping with the hypothalamus. *Nat Neurosci* 2002; 5: 1071-1075.
- 4 Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 2000; 6: 991-997.
- 5 Dauvilliers Y, Blouin JL, Neidhart E, Carlander B, Eliaou JF, Antonarakis SE, et al. A narcolepsy susceptibility locus maps to a 5 Mb region of chromosome 21q. *Ann Neurol* 2004; 56: 382-388.
- 6 Nakayama J, Miura M, Honda M, Miki T, Honda Y, Arinami T. Linkage of human narcolepsy with HLA association to chromosome 4p13-q21. *Genomics* 2000; 65: 84-86.
- 7 Mignot E. Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology* 1998; 50: 16S-22S.
- 8 Malik S, Boeve BF, Krahn LE, Silber MH. Narcolepsy associated with other central nervous system disorders. *Neurology* 2001; 57: 539-541.
- 9 Nishino S, Mignot E. Pharmacological aspects of human and canine narcolepsy. *Prog Neurobiol* 1997; 52: 27-28.

- 10 Martinez-Rodriguez JE, Iranzo A, Santamaria J, Genis D, Molins A, Silva Y, et al. Estado de mal catapléjico inducido por la retirada brusca de clomipramina. *Neurología* 2002 17: 113-116.
- 11 Oka Y, Inoue Y, Kanbayashi T, Kuroda K, Miyamoto M, Miyamoto T, et al. Narcolepsy without cataplexy: two subtypes based on CSF hypocretin-1/orexin A findings. *Sleep* 2006; 29: 1439-1443.
- 12 Schuld A, Hebebrand J, Geller F, Pollmacher T. Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet* 2000; 355: 1274-1275.
- 13 American Academy of Sleep Medicine. ICSD-2, the international classification of sleep disorders: diagnostic and coding manual, 2nd ed. Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine; 2005.
- 14 Aldrich MS, Chervin RD, Malow BA. Value of the multiple sleep latency test (MSLT) for the diagnosis of narcolepsy. *Sleep* 1997; 20: 620-629.
- 15 Mignot E, Lin L, Finn L, Lopes C, Pluff K, Sundstrom ML, et al. Correlates of sleep-onset REM periods during the Multiple Sleep Latency Test in community adults. *Brain* 2006; 129: 1609-23.
- 16 Chervin RD, Aldrich MS. Sleep onset REM periods during multiple sleep latency test in patients evaluated for sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 426-431.
- 17 de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 322-327.
- 18 Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-585.

- 19 Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 2001; 435: 6-25.
- 20 Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998; 18: 9996-10015.
- 21 John J, Wu MF, Boehmer LN, Siegel JM. Cataplexy-active neurons in the hypothalamus: implications for the role of histamine in sleep and waking behaviour. *Neuron* 2004; 42: 619-634.
- 22 Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, et al. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10911-10916.
- 23 Bourgin P, Huitron-Resendiz S, Spier AD, Fabre V, Motre B, Criado JR, et al. Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci* 2000; 20: 7760-7765.
- 24 Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A, Kawamura H, Tsujino N, Muraki Y, et al. Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron* 2005; 46: 297-308.
- 25 Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 1999; 98: 365-376.
- 26 Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999; 98: 437-451.

- 27 Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, et al. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 2001; 30: 345-354.
- 28 Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Tokita S, Williams SC, Kisanuki YY, et al. Distinct narcolepsy syndromes in orexin receptor-2 and orexin null mice: molecular genetic dissection of non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron* 2003; 38:715-730.
- 29 Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 2000; 355: 39-40.
- 30 Nishino S, Ripley B, Overeem S, Nevsimalova S, Lammers GJ, Vankova J, et al. Low cerebrospinal fluid hypocretin (orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy. *Ann Neurol* 2001; 50: 381-388.
- 31 Ripley B, Overeem S, Fujiki N, Nevsimalova S, Uchino M, Yesavage J, et al. CSF hypocretin/orexin levels in narcolepsy and other neurological conditions. *Neurology* 2001; 57: 2253-2258.
- 32 Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, Okun M, Nevsimalova S, Overeem S, et al. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol* 2002; 59: 1553-1562.
- 33 Dauvilliers Y, Baumann CR, Carlander B, Bischof M, Blatter T, Lecendreux M, et al. CSF hypocretin-1 levels in narcolepsy, Kleine-Levin syndrome, and other hypersomnias and neurological conditions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 1667-1673.
- 34 Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, et al. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 2000; 27: 469-474.

- 35 Blouin AM, Thannickal TC, Worley PF, Baraban JM, Reti IM, Siegel JM. Narp immunostaining of human hypocretin (orexin) neurons: loss in narcolepsy. *Neurology* 2005; 65: 1189-1192.
- 36 Crocker A, España RA, Papadopoulou M, Saper CB, Faraco J, Sakurai T, et al. Concomitant loss of dynorphin, NARP, and orexin in narcolepsy. *Neurology* 2005 ; 65 : 1184-1188.
- 37 Thannickal TC, Siegel JM, Nienhuis R, Moore RY. Pattern of hypocretin (orexin) soma and axon loss, and gliosis, in human narcolepsy. *Brain Pathol* 2003; 13: 340-351.
- 38 Taheri S, Sunter D, Dakin C, Moyes S, Seal L, Gardiner J, et al. Diurnal variation in orexin A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA in the rat central nervous system. *Neurosci Lett* 2000; 279: 109-112.
- 39 Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, et al. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin-A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 1075-1081.
- 40 Abrahamsom EE, Leak RK, Moore RY. The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 2001; 12: 435-440.
- 41 Chou TC, Scammell TC, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* 2003; 23: 10691-10702.
- 42 Zhang S, Zeitzer JM, Yoshida Y, Wisor JP, Nishino S, Edgar DM, et al. Lesions of the suprachiasmatic nucleus eliminate the daily rhythm of hypocretin-1 release. *Sleep* 2004, 27: 619-627.

- 43 Deboer T, Overeem S, Visser NA, Duindam H, Frolich M, Lammers GJ, Meijer JH. Convergence of circadian and sleep regulatory mechanisms on hypocretin-1. *Neuroscience* 2004; 129: 727-732.
- 44 Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, et al. Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci* 2001; 21: 1656-1662.
- 45 Pedrazzoli M, D'Almeida V, Martins PJ, Machado RB, Ling L, Nishino S, et al. Increased hypocretin-1 levels in cerebrospinal fluid after REM sleep deprivation. *Brain Res* 2004; 995: 1-6.
- 46 Kiyashchenko LI, Mileykovskiy BY, Maidment N, Lam HA, Wu MF, John J, et al. Release of hypocretin (orexin) during waking and sleep states. *J Neurosci* 2002; 22: 5282-5286.
- 47 Wu MF, John J, Maidment N, Lam HA, Siegel JM. Hypocretin release in normal and narcoleptic dogs after food and sleep deprivation, eating, and movement. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: R1079-R1086.
- 48 Torterolo P, Yamuy J, Sampogna S, Morales FR, Chase MH. Hypocretinergic neurons are primarily involved in activation of the somatomotor system. *Sleep* 2003; 26: 25-28.
- 49 Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM. Behavioral correlates of activity in identified hypocretin / orexin neurons. *Neuron* 2005; 46: 787-798.
- 50 Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 2005; 437: 556-559.
- 51 Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, et al. Interaction between the corticotrophin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci* 2004; 24: 11439-11448.

- 52 Yoshimichi G, Yoshimatsu H, Masaki T, Sakata T. Orexin-A regulates body temperature in coordination with arousal status. *Exp Biol Med* 2001; 226: 468-476.
- 53 von Economo C. Sleep as a problem of localization. *J Nerv Ment Dis* 1930; 71: 249-259.
- 54 Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB. Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 1996; 271: 216-219.
- 55 Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 2005; 437: 1257- 1263.
- 56 Coleman CG, Lydic R, Baghdoyan HA. M2 muscarinic receptors in pontine reticular formation of C57BL/6J mouse contribute to rapid eye movement sleep generation. *Neuroscience* 2004; 126: 821-830.
- 57 Saper CB, Chou TC, Scammell TE. The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci* 2001; 24: 726-731.
- 58 Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley J. The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci* 2005; 28: 152-157.
- 59 Borbély AA, Tobler I. Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation. *Physiol Rev* 1989; 69: 605-670.
- 60 Strecker RE, Morairty S, Thakkar MM, Porkka-Heiskanen T, Basheer R, Dauphin LJ, et al. Adenosinergic modulation of basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behav Brain Res* 2000; 115: 183-204.
- 61 Blanco-Centurion C, Xu M, Murillo-Rodriguez E, Gerashchenko D, Shiromani A, Salin-Pascual RJ, et al. Adenosine and sleep homeostasis in the basal forebrain. *J Neurosci* 2006; 26: 8092-8100.

- 62 Cushing H, Goetsch E. Concerning the secretion of infundibular lobe of the pituitary body and its presence in the cerebrospinal fluid. *Am J Physiol* 1910; 27: 60-86.
- 63 Post RM, Gold PW, Rubinow DR, Bunney WE, Ballenger JC, Goodwin FK. Cerebrospinal fluid as neuroregulatory pathway. Peptides in neuropsychiatric illness. In: Wood JH, ed. *Neurobiology of cerebrospinal fluid*. New York: Plenum Press, 1983: 107-141.
- 64 Chen CT, Dun SL, Kwok EH, Dun NJ, Chang JK. Orexin A-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci Letters* 1999; 260: 161-164.
- 65 Milhorat TH, Hammock MK. Cerebrospinal fluid as reflection of internal milieu of brain. In: Wood JH, ed. *Neurobiology of cerebrospinal fluid*. New York: Plenum Press, 1983: 1-23.
- 66 Baumann CR, Dauvilliers Y, Mignot E, Bassetti CL. Normal CSF hypocretin-1 (orexin-A) levels in dementia with Lewy bodies associated with excessive daytime sleepiness. *Eur Neurol* 2004; 52: 73-76.
- 67 Kanbayashi T, Yano T, Ishiguro H, Kawanishi K, Chiba S, Aizawa R, et al. Hypocretin-1 (orexin-A) in human lumbar CSF in different age groups: infants to elderly persons. *Sleep* 2002; 25: 337-339.
- 68 Gerashchenko D, Murillo-Rodriguez E, Lin L, Xu M, Hallett L, Nishino S, et al. Relationship between CSF hypocretin levels and hypocretin neuronal loss. *Exp Neurol* 2003; 184: 1010-1016.
- 69 Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, Honda K, Mignot E, Nishino S. Changes in CSF hypocretin (orexin-A) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation. *Neuroreport* 2001; 12: 993-997.



- 70 Zeitzer JM, Buckmaster CL, Parker KJ, Hauck CM, Lyons DM, Mignot E. Circadian and homeostatic regulation of hypocretin in a primate model: implications for the consolidation of wakefulness. *J Neurosci* 2003; 23: 3555-3560.
- 71 Salomon RM, Ripley B, Kennedy JS, Johnson B, Schmidt D, Zeitzer JM, et al. Diurnal variation of cerebrospinal fluid hypocretin-1 (orexin-A) levels in control and depressed subjects. *Biol Psychiatry* 2003; 54: 96-104.
- 72 Kubota H, Kanbayashi T, Tanabe Y, Ito M, Takanashi JI, Kohno Y, Shimizu T. Decreased cerebrospinal fluid hypocretin-1 levels near the onset of narcolepsy in 2 prepubertal children. *Sleep* 2003 ; 26 : 555-557.
- 73 Krahn LE, Pankratz VS, Oliver L, Boeve BF, Silber MH. Hypocretin (orexin) levels in cerebrospinal fluid of patients with narcolepsy: relationship to cataplexy and HLA DQB1\*0602 status. *Sleep* 2002; 25: 733-736.
- 74 Nishino S, Kanbayashi T, Fujiki N, Uchino M, Ripley B, Watanabe M, et al. CSF hypocretin levels in Guillain-Barré syndrome and other inflammatory neuropathies. *Neurology* 2003; 61: 823-825.
- 75 Overeem S, Dalmau J, Bataller L, Nishino S, Mignot E, Verschuuren J, Lammers GJ. Hypocretin-1 CSF levels in anti-Ma2 associated encephalitis. *Neurology* 2004; 62: 138-140.
- 76 Baumann CR, Stocker R, Imhof HG, Trentz O, Hersberger M, Mignot E, Bassetti CL. Hypocretin-1 (orexin A) deficiency in acute traumatic brain injury. *Neurology* 2005; 65: 147-149.
- 77 Honda Y, Asaka A, Tanaka Y, Juji T. Discrimination of narcolepsy by using genetic markers and HLA. *Sleep Res* 1983;12; 254.

- 78 Mignot E, Lin L, Rogers W, Honda Y, Qiu X, Lin X, et al. Complex HLA-DR and DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 686-699.
- 79 Smith AJ, Jackson MW, Neufing P, McEvoy RD, Gordon TP. A functional autoantibody in narcolepsy. *Lancet* 2004; 364: 2122-2124.
- 80 Black JL, Avula RK, Walker DL, Silber MH, Krahn LE, Pankratz VS, et al. HLA DQB1\*0602 positive narcoleptic subjects with cataplexy have CSF IgG reactive to rat hypothalamic protein extract. *Sleep* 2005; 28: 1191-1192.
- 81 Lecendreux M, Maret S, Bassetti C, Mouren MC, Tafti M. Clinical efficacy of high-dose intravenous immunoglobulins near the onset of narcolepsy in a 10-year-old boy. *J Sleep Res* 2003; 12: 347-348.
- 82 Dauvilliers Y, Carlander B, Rivier F, Touchon J, Tafti M. Successful management of cataplexy with intravenous immunoglobulins at narcolepsy onset. *Ann Neurol* 2004; 56: 905-908.
- 83 Rosenfeld MR, Eichen JG, Wade DF, Posner JB, Dalmau J. Molecular and clinical diversity in paraneoplastic immunity to Ma proteins. *Ann Neurol* 2001; 50: 339-348.
- 84 Hinze-Selch D, Wetter TC, Zhang Y, Lu HC, Albert ED, Mullington J, et al. In vivo and in vitro immune variables in patients with narcolepsy and HLA-DR2 matched controls. *Neurology* 1998; 50: 1149-52.
- 85 Tanaka S, Honda Y, Inoue Y, Honda M. Detection of autoantibodies against hypocretin, hcrt1, and hcrt2 in narcolepsy: anti-Hcrt system antibody in narcolepsy. *Sleep* 2006; 29: 633-638.
- 86 Black JL, Silber MH, Krahn LE, Avula RK, Walker DL, Pankratz VS, et al. Studies of humoral immunity to preprohypocretin in human leukocyte antigen

DQB1\*0602-positive narcoleptic subjects with cataplexy. *Biol Psychiatry* 2005; 58: 504-509.

87 Overeem S, Verschuuren J, Fronczek R, Schreurs L, den Hertog H, Hegeman-Kleinn IM, et al. Immunohistochemistry screening for autoantibodies against lateral hypothalamic neurons in human narcolepsy. *J Neuroimmunology* 2006; 174: 187-191.

88 Fredrikson S, Carlander B, Billiard M, Link H. CSF immune variables in patients with narcolepsy. *Acta Neurol Scand* 1990; 81: 253-254.

89 Black JL, Krahn LE, Pankratz VS, Silber M. Search for neuron-specific and nonneuron-specific antibodies in narcoleptic patients with and without HLA DQB1\*0602. *Sleep* 2002; 25: 719-723.

90 Okun ML, Lin L, Pelin Z, Hong S, Mignot E. Clinical aspects of narcolepsy-cataplexy across ethnic groups. *Sleep* 2002; 25: 27-35.

91 Mignot E, Young T, Lin L, Finn L. Nocturnal sleep and daytime sleepiness in normal subjects with HLA DQB1\*0602. *Sleep* 1999; 22: 347-352.

92 Glantz RH, Wright RB, Huckman MS, Garron DC, Siegel IM. Central nervous system magnetic resonance imaging findings in myotonic dystrophy. *Arch Neurol* 1988; 45: 36-37.

93 Yoshimura N, Otake M, Igarashi K, Matsunaga M, Takebe K, Kudo H. Topography of Alzheimer's neurofibrillary change distribution in myotonic dystrophy. *Clin Neuropathol* 1990; 9: 234-239.

94 Ono S, Inoue K, Mannen T, Kanda F, Jinnai K, Takahashi K. Neuropathological changes in the brain in myotonic dystrophy: some new observations. *J Neurol Sci* 1987; 81: 301-320.

95 Mahler C, Parizel G. Hypothalamic-pituitary function in myotonic dystrophy. *J Neurol* 1982; 226: 233-242.

- 96 Gibbs JW, Ciafaloni E, Radtke RA. Excessive daytime somnolence and increased rapid eye movement pressure in myotonic dystrophy. *Sleep* 2002; 25: 672-675.
- 97 Cirignotta F, Mondini S, Zucconi M, Barrot-Cortes E, Sturani C, Schiavina M, et al. Sleep-related breathing impairment in myotonic dystrophy. *J Neurol* 1987; 235: 80-85.
- 98 Hansotia P, Frens D. Hypersomnia associated with alveolar hypoventilation in myotonic dystrophy. *Neurology* 1981; 31: 1336-1337.
- 99 van der Meché FGA, Bogaard JM, van der Sluys JCM, Schimsheimer RJ, Ververs CCM, Busch HFM. Daytime sleep in myotonic dystrophy is not caused by sleep apnea. *J Neurology Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 626-628.
- 100 Park YD, Radtke RA. Hypersomnolence in myotonic dystrophy: demonstration of sleep onset REM sleep. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 58: 512-513.
- 101 Sforza E, Montagna P, Tinuper P, Cortelli P, Avoni P, Ferrillo F, et al. Sleep-wake cycle abnormalities in fatal familial insomnia. Evidence of the role of the thalamus in sleep regulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1995; 94: 398-405.
- 102 Manetto V, Medori R, Cortelli P, Montagna P, Tinuper P, Baruzzi A, et al. Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases. *Neurology* 1992; 42: 312-319.
- 103 Montagna P. Fatal familial insomnia: a model disease in sleep physiopathology. *Sleep Med Rev* 2005; 9: 339-353.
- 104 Velayos JL, Reinoso-Suarez F. Organization of projections from the reticular thalamic nucleus, hypothalamus and basal prosencephalon to the intralaminar and medial thalamic nuclei. En: *The diencephalons and sleep*. Mancina M, Marini G, eds. New York: Raven press; 1990: 249-261.

- 105 Graus F, Dalmau J, Valldeoriola F, Ferrer I, Rene R, Marin C, et al. Immunological characterization of a neuronal antibody (anti-Tr) associated with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *J Neuroimmunol* 1997; 74: 55-61.
- 106 Bataller L, Rosenfeld MR, Graus F, Vilchez JJ, Cheung NK, Dalmau J. Autoantigen diversity in the opsoclonus-myoclonus syndrome. *Ann Neurol* 2003; 53: 347-353.
- 107 Urakami Y, Miyamoto Y, Matsunaga H, Owada M, Kitagawa T. Serial changes in the prevalence of islet cell antibodies and islet cell antibody titer in children with IDDM of abrupt or slow onset. *Diabetes Care* 1995; 18: 1095-1099.
- 108 de Bellis A, Bizzarro A, Rossi R, Paglionico VA, Criscuolo T, Lombardi G, et al. Remission of subclinical adrenocortical failure in subjects with adrenal autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 1002-1007.