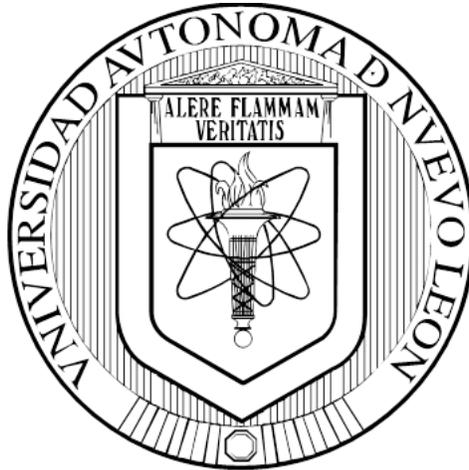


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *EBF2* DURANTE EL  
DESARROLLO DEL HIPOTÁLAMO LATERAL DE RATÓN**

**POR**

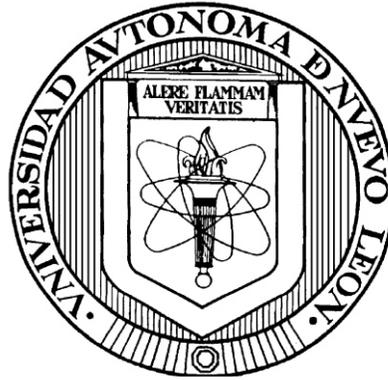
**XICO ALBERTO ACOSTA VILLALOBOS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**JULIO, 2018**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *EBF2* DURANTE EL  
DESARROLLO DEL HIPOTÁLAMO LATERAL DE RATÓN

Por

XICO ALBERTO ACOSTA VILLALOBOS

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Julio, 2018

ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *EBF2* DURANTE EL  
DESARROLLO DEL HIPOTÁLAMO LATERAL DE RATÓN

Aprobación de la Tesis:



---

Dr. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret  
Directora de Tesis



---

Dr. C. Román Vidal Tamayo Ramírez  
Co-director de Tesis



---

Dr. C. Alberto Camacho Morales  
Miembro de la Comisión



---

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez  
Subdirector de Estudios de Posgrado

# ÍNDICE

Resumen.....	1
ABREVIATURAS.....	2
I. MARCO TEÓRICO .....	4
1. AREA HIPOTALÁMICA LATERAL .....	4
1.1 Generalidades.....	4
1.2 Poblaciones neuronales .....	4
2. SISTEMA OREXINÉRGICO .....	5
2.1 Introducción .....	5
2.3 Transducción de señal orexinérgica.....	7
2.4 Neurofisiología del sistema orexinérgico .....	9
2.5 Funciones .....	13
2.6 Patologías asociadas.....	18
2.7 Terapias dirigidas al sistema orexinérgico.....	20
2.8 Aspectos del desarrollo .....	22
3. Factor de células B tempranas 2 - <i>EBF2</i> .....	24
3.1 Generalidades.....	24
3.2 Función y localización .....	25
3.3 Desarrollo en el modelo de ratón .....	25
II. ANTECEDENTES.....	26
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	29
IV. JUSTIFICACIÓN.....	29
V. HIPÓTESIS.....	29
VI. OBJETIVOS .....	30

Objetivo general.....	30
Objetivos específicos .....	30
VII. METODOLOGÍA .....	31
Estrategia general.....	31
Modelo de estudio.....	31
1. Obtención de cerebros adultos .....	31
VIII. RESULTADOS.....	38
Objetivo 1. Determinar si las neuronas de orexina producen EBF2 en el ratón adulto .....	38
Estandarización .....	38
Ensayo de doble marcaje.....	38
Objetivo 2. Determinar si hay presencia de EBF2 durante el desarrollo embrionario en las neuronas de orexina.....	39
Objetivo 3. Determinar si otras poblaciones neuronales del hipotálamo lateral producen EBF2. ....	43
MCH .....	43
CART .....	43
Neuropéptido Y.....	43
Receptor de leptina LepR.....	44
Neurotensina .....	45
Discusión.....	47
Conclusión .....	51
REFERENCIAS.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales poblaciones neuronales del hipotálamo lateral. ....	5
Figura 2. Orexinas y receptores de orexina. ....	6
Figura 3. Señalización intracelular por estímulos orexinérgicos. ....	8
Figura 4. Conexiones principales del sistema orexinérgico. ....	11
Figura 5. Expresión de los distintos receptores de orexinas de los distintos grupos neuronales. ....	12
Figura 6. Regulación de las fases de sueño REM y NREM. ....	15
Figura 7. Modelo de un dímero de Ebf1, parálogo de Ebf2. ....	24
Figura 8. Inmunofluorescencia en ratones Ebf-null. ....	27
Figura 9. Alineamiento de promotor de <i>Hcrt</i> . ....	27
Figura 10. Resultado de ensayo de gen reportero luciferase y EMSA. ....	28
Figura 11. Orexina-A y EBF2 en el adulto. ....	39
Figura 12. Presencia de orexina-B fuera del sistema nervioso. ....	40
Figura 13. Presencia de OXN en hipotálamo en el desarrollo embrionario. ....	42
Figura 14. Ausencia de EBF2 en células MCH, CART y NPY del LHA. ....	44
Figura 15. Resultado de ensayo de EBF2 con LepR, Nts y ppNts. ....	46

## Resumen

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE *EBF2* DURANTE EL  
DESARROLLO DEL HIPOTÁLAMO LATERAL DE RATÓN

Número de páginas 65

Xico Alberto Acosta Villalobos

Julio 2018

Área del estudio- desarrollo del sistema nervioso

Propósito y método del estudio. El área hipotalámica lateral es una región del cerebro que juega un papel fundamental en la regulación de aspectos clave del comportamiento en vertebrados. Se ha visto que el factor de transcripción EBF2 y las orexinas tienen una relación recíproca en dicha región. Sin embargo, no se conoce la naturaleza de esta relación.

El objetivo del estudio es definir el patrón de expresión de *Ebf2* durante el desarrollo del hipotálamo lateral en el modelo *Mus musculus* y conocer su relación con las neuronas de orexina. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de doble marcaje dirigido hacia EBF2 y hacia orexinas y otros péptidos del hipotálamo lateral, en el ratón adulto y en embriones. Para esto, se realizó eutanasia de ratones adultos y ratones gestantes para obtener cerebros de adultos y embriones en etapas E14.0, E15.0 y E17.0.

Contribuciones y conclusiones. EBF2 se expresa en el hipotálamo lateral del ratón. A ese mismo nivel, y de manera intercalada, se encuentran cuerpos de neuronas de orexina-B, MCH, CART, neurotensina y receptor de leptina. EBF2 no colocaliza con orexina-B, MCH o CART. Del receptor de leptina no se obtuvieron resultados concluyentes. Neurotensina presenta colocalización con EBF2 en una proporción de sus neuronas. En el embrión, se encontró presencia de EBF2 en el hipotálamo en desarrollo, así como cuerpos de neuronas de orexina-A, sin colocalización. Como hallazgo, EBF2 colocaliza con CART en algunas de las neuronas del epitelio olfatorio. EBF2 se detecta en el hipotálamo desde fases embrionarias y persiste en el hipotálamo lateral en la etapa adulta, por lo que pudiera jugar un papel importante en el desarrollo de dicha región. Se concluye que aunque las neuronas de orexina requieren de la función de EBF2 por los antecedentes, dicha función no se da por regulación directa del gen *HCRT* o de otros genes dentro de las neuronas de orexina, y la relación parece ser indirecta.

---

Dra. en C. Viviana Chantal Zomosa Signoret  
Director de Tesis

## ABREVIATURAS

6-FAM – 6-carboxifluoresceína	ERK – cinasa regulada por señal extracelular
AC – adenilato ciclasa	FISH – hibridación <i>in situ</i> fluorescente
ACTH – hormona adrenocorticotrópica	GABA – ácido aminobutírico gamma
ARAS – sistema activador reticular ascendente	GC – guanilato ciclasa
Arc – núcleo arqueado	GIRK – canales de calcio regulados por proteína G
ARN – ácido ribonucleico	GLUT – transportador de glucosa
BNST – núcleo del lecho de la estría terminal	GnRH – hormona liberadora de gonadotropina
cAMP – monofosfato de adenosina cíclico	HCRT – gen hipocretina (gen prepro-orexina)
cDNA – ADN complementario	HLA – antígeno leucocitario humano
COE2 – nombre alternativo de EBF2	HLH – hélice bucle hélice
CRH – hormona liberadora de corticotropina	HRP – peroxidasa de rábano picante
DAPI – 4',6-diamino-2-fenilindol	ICV – intracerebroventricular
EBF2 – factor de células B tempranas 2	IP3 – inositol trifosfato
DEPC – dietil pirocarbonato	KO – knockout
DORA – antagonista dual de receptor de orexina	LC – locus cerúleo
dpc – día post-coito	LepR – receptor de leptina
DR – rafe dorsal	LCR – líquido cefalorraquídeo
DREM – transición directa de vigilia a sueño REM	LDT – núcleo tegmental laterodorsal
E1 – día embrionario 1	LHA – área hipotalámica lateral
EBF2 – factor de células B tempranas 2	LTu – núcleo tuberal lateral
EDTA – ácido etilendiaminotetraacético	MAPK – cinasa de proteína activada por mitógeno
EMSA – ensayo de retardo en la movilidad electroforética	MCH – hormona concentradora de melanina
	mRNA – ARN mensajero

NAc – núcleo accumbens  
 NMDA – *N*-metil-D-aspartato  
 NO – óxido nítrico  
 NPY – neuropéptido Y  
 NREM – sueño no-REM  
 Nts – neurotensina  
 NTS – núcleo del tracto solitario  
 O/E-3 – nombre alternativo de EBF2  
 OX – orexina  
 OX-A – orexina-A  
 OX-B – orexina-B  
 OXN – neurona de orexina  
 OXR-1 – receptor de orexinas 1  
 OXR-2 – receptor de orexinas 2  
 P1 – día postnatal 1  
 PAG – sustancia gris periacueductal  
 PBS – solución salina tamponada con fosfato  
 PCR – reacción en cadena de la polimerasa  
 PeF – núcleo hipotalámico perifornical  
 PH – área hipotalámica posterior  
 PI3-K – fosfatidilinositol 3-cinasa  
 PLA2 – fosfolipasa A2  
 PLC – fosfolipasa C  
 PLD – fosfolipasa D  
 POA – área preóptica  
 POMC – proopiomelanocortina  
 ppNts – prepro-neurotensina  
 PPT – núcleo pedunculopontino  
 pPVN – núcleo paraventricular, fracción parvocelular  
 PVN – núcleo paraventricular  
 qPCR – reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real  
 REM – sueño de movimientos oculares rápidos  
 REM-on – neuronas activas durante REM  
 RT – retrotranscripción  
 SORA – antagonista sencillo de receptor de orexina  
 TBS – solución salina tamponada con Tris  
 TMN – núcleo tuberomamilar  
 TRP – receptor de potencial transitorio  
 VLPO – núcleo preóptico ventrolateral  
 VTA – área ventral tegmental  
 W/REM-on – neuronas activas durante vigilia y REM

# I. MARCO TEÓRICO

## 1. AREA HIPOTALÁMICA LATERAL

### *1.1 Generalidades*

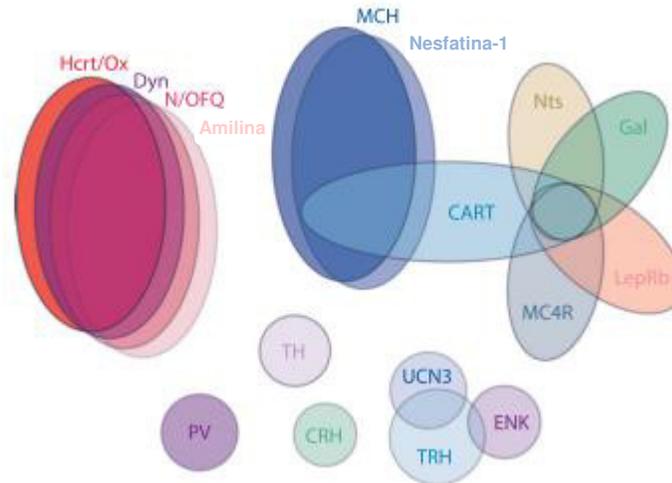
El hipotálamo es una estructura cerebral altamente conservada en especies de vertebrados con una función esencial en la regulación de aspectos claves en la homeostasis fisiológica y en el comportamiento.<sup>1</sup>

Se localiza en la porción más ventral del prosencéfalo. El hipotálamo es considerado un centro de respuesta para mantener un equilibrio homeostático, ya que recibe una gran cantidad de estímulos neurales y humorales del organismo y, a su vez, controla al sistema endócrino, autónomo y otras áreas del sistema nervioso central.<sup>1</sup> La función hipotalámica depende del efecto de una red altamente diferenciada de núcleos hipotalámicos con distintas poblaciones, circuitos y neurotransmisores.<sup>2</sup>

El área lateral hipotalámica (LHA) o hipotálamo lateral, juega un papel fundamental en la regulación de aspectos clave del comportamiento en vertebrados, como excitación, ingesta, balance energético, estrés, recompensa y conducta motivada. En las últimas décadas, ha habido un progreso sostenido en la comprensión de la función del LHA con descubrimientos a nivel celular, molecular y de sistemas. Sin embargo, los mecanismos básicos que explican la función de los circuitos del LHA se comprenden poco, debido a la heterogeneidad neuronal, complejidad citoarquitectónica y función dependiente de estado conductual.<sup>2</sup>

### *1.2 Poblaciones neuronales*

Las neuronas del LHA se identifican por la expresión de marcadores específicos, como neuropéptidos o receptores (figura 1). Las dos principales poblaciones del LHA son las neuronas de orexina<sup>3,4</sup> y las neuronas de hormona concentradora de melanina (MCH)<sup>5</sup>. Sin embargo, existen otras poblaciones específicas, algunas con marcadores que se superponen: CART, neurotensina, galanina, LepRb, MC4R, entre otras (Figura 1).<sup>2</sup>



**Figura 1. Principales poblaciones neuronales del hipotálamo lateral.**

Representación esquemática de tipos celulares en LHA. Abreviaciones: CART – transcrito regulado por cocaína y anfetamina, CRH – hormona liberadora de corticotropina, Dyn – dinorfina, Enk – encefalina, Gal – galanina, Hcrt/Ox – hipocretina/orexina, LepRb – forma larga del receptor de leptina, MC4R – receptor de melanocortina 4, MCH – hormona concentradora de melanina, Nts – neurotensina, N/OFQ – nociceptina-orfanina FQ, PV – parvalbúmina, TH – hidroxilasa de tirosina, TRH – hormona liberadora de tirotrina, UCN3- urocortina-3.<sup>2</sup>

## 2. SISTEMA OREXINÉRGICO

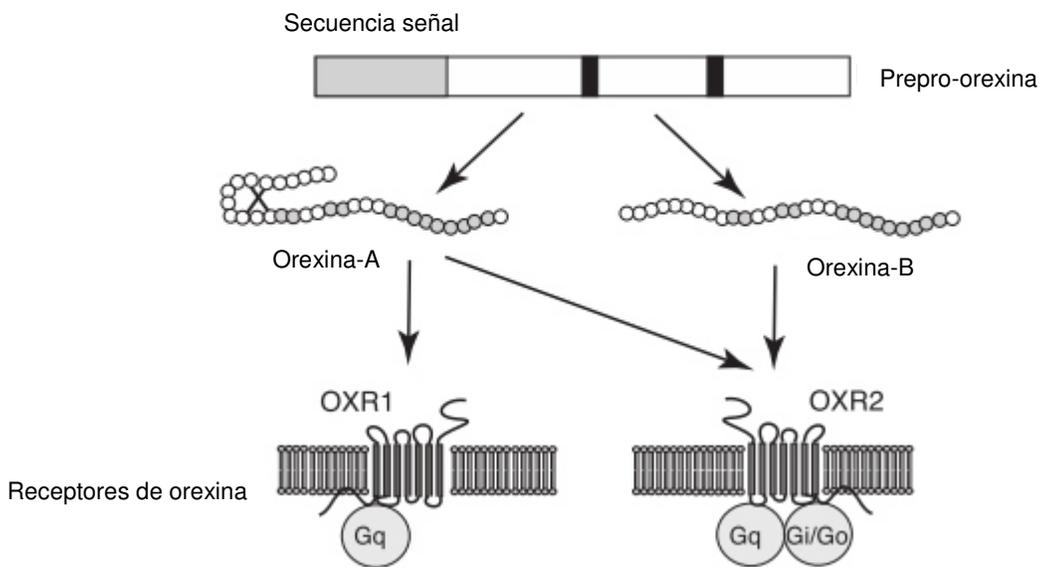
### 2.1 Introducción

El sistema orexinérgico es un sistema neuronal compuesto por una población pequeña de neuronas que producen orexinas como neurotransmisores. Éstas tienen un efecto excitatorio en las regiones que promueven vigilia, tales como corteza cerebral, hipotálamo, tálamo y tallo cerebral<sup>6</sup>. En el humano adulto, se estima un número de 70,000 neuronas orexinérgicas<sup>7</sup>, mientras que en el ratón, se estima un promedio de 1400-2000 neuronas<sup>8,9</sup>.

Existen dos orexinas (OX), A y B, también conocidas como hipocretinas 1 y 2, respectivamente<sup>6</sup>. Fueron descritas por primera vez en 1998 por dos grupos diferentes. Sakurai y colaboradores las llamaron orexinas, ya que descubrieron que éstas incrementan la ingesta al administrarse en ratas<sup>4</sup>. De Lecea y colaboradores, por otro lado, las llamaron hipocretinas, un término derivado de las palabras “hipotálamo”, por su localización, y “secretina”, por su homología con la secretina<sup>3</sup>.

Las orexinas son neurotransmisores de naturaleza peptídica, los cuales constituyen una familia única al no presentar homología con otros péptidos descritos<sup>10</sup>. Ambas orexinas se derivan de un péptido precursor común, llamado prepro-orexina<sup>3</sup> (figura 2), producto del gen hipocretina (*HCRT*). Este gen tiene una longitud de 1432 pb, y está compuesto por dos exones separados por un intrón.<sup>11</sup>

Orexina-A (OX-A) es un péptido de 33 residuos aminoacídicos, con un residuo piroglutamil en el extremo N-terminal, dos puentes disulfuro internos y amidación C-terminal. Su estructura se conserva completamente en mamíferos<sup>10</sup>. Orexina-B (OX-B) es un péptido lineal de 28 residuos aminoacídicos, con amidación en extremo C-terminal. Su secuencia de aminoácidos se encuentra altamente conservada entre especies, y la mitad C-terminal es muy similar a la de orexina A<sup>10</sup>.



**Figura 2. Orexinas y receptores de orexina.**

Ambos péptidos, orexina-A y orexina-B provienen de un precursor llamado prepro-orexina. El receptor de orexina 1 (OXR1) es específico para Orexina-A, y está acoplado a proteína Gq, mientras que el receptor de orexina 2 (OXR2) reconoce ambos péptidos y está acoplado a proteína Gq o Gi/Go.<sup>10</sup>

Además de liberar orexinas, las neuronas del sistema orexinérgico también liberan glutamato<sup>12</sup>, dinorfina<sup>13</sup> y neurotensina<sup>14</sup>. Estos neurotransmisores actúan en sinergia con las orexinas. Sin embargo, las orexinas juegan el papel principal dentro del sistema orexinérgico, ya que los modelos nulos para orexinas o para receptores de orexinas, y los modelos de ablación de neuronas de orexina presentan un fenotipo similar<sup>15</sup>.

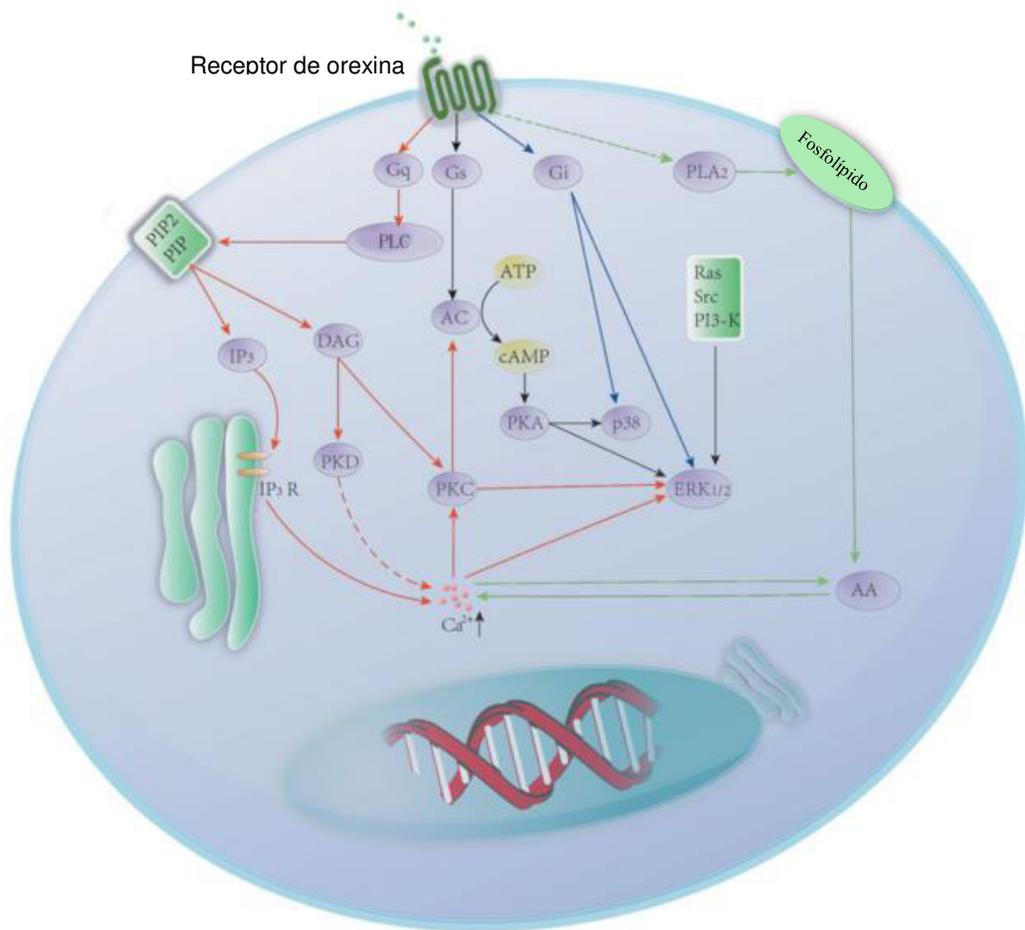
### 2.3 Transducción de señal orexinérgica

Se han descrito dos receptores de orexinas, OXR-1 y OXR-2, también conocidos como HCRTR-1 y HCRTR-2. OXR-2 tiene la misma afinidad para ambos péptidos, mientras que OXR-1 presenta una mayor afinidad para orexina A. Son receptores acoplados a proteína G, de clases  $G_q$ ,  $G_s$  y  $G_i$ <sup>16-18</sup>.

La transducción de señal de las orexinas se puede dar por diferentes vías intracelulares (figura 3). Las principales vías son las vías de fosfolipasa C (PLC)<sup>18,19</sup> – inositol trifosfato y diacilglicerol- y la vía adenilato ciclasa (AC)<sup>17</sup>. La vía fosfolipasa C activa la cascada de fosfatidilinositol y la entrada de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  extracelular por canales TRP para despolarizar a la neurona<sup>10</sup>. Tanto la vía PLC como la vía AC pueden activar la vía ERK1/2 - MAP cinasas (MAPK)<sup>18</sup>, promoviendo proliferación celular en neuronas<sup>20,21</sup> y células suprarrenales<sup>22</sup>.

Las orexinas activan otras vías en algunos casos, como la vía fosfolipasa A2 (PLA2)<sup>23</sup>, vía fosfolipasa D (PLD)<sup>24</sup>, vía de las caspasas en células cancerígenas<sup>25</sup>, vía óxido nítrico/guanilato ciclasa (NO/sGC) en el núcleo del tracto solitario (NTS)<sup>26</sup>, y PI3-K/Akt, involucrado en la translocación de GLUT4 para incrementar la captación de glucosa<sup>27</sup>.

El tipo de proteína G al que se acopla el receptor puede variar dependiendo de la zona o del tejido en el que se encuentra. En neuronas del NTS<sup>28</sup>, e hipotálamo medial y lateral, se encuentra  $G_q$ <sup>29</sup>, mientras que en neuronas POMC, las orexinas activan proteínas  $G_i$  y reducen niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ <sup>30</sup>. En neuronas de ganglios simpáticos, ocurre una activación de proteínas  $G_i$  con una inhibición de canales  $K^+$ <sup>31</sup>. En la corteza adrenal, OXR-2 se acoplan a  $G_q$  y  $G_s$  y activan la vía cAMP e IP3<sup>32</sup>.



**Figura 3. Señalización intracelular por estímulos orexinérgicos.**

Existen varias vías de señalización intracelular con las cuales se lleva a cabo el efecto de las orexinas en la célula diana. Entre ellas, se encuentran vías como PLC, AC, MAPK y PLA2, las cuales inician al activarse el receptor de orexina por actividad de la proteína G correspondiente (Gq, Gs o Gi).<sup>33</sup>

## 2.4 Neurofisiología del sistema orexinérgico

### Localización

Las neuronas orexinérgicas se localizan en la parte posterior del hipotálamo, específicamente en el área hipotalámica lateral (LHA), núcleo perifornical, núcleo dorsomedial y área dorsal<sup>34-36</sup>. El hipotálamo lateral es una región de organización laxa<sup>37</sup>, donde además de los grupos de neuronas orexinérgicas, se encuentra una población de neuronas que produce hormona concentradora de melanina (MCH)<sup>35</sup>.

### Regulación de las neuronas orexinérgicas

Las neuronas de orexina (OXN) reciben estímulos aferentes principalmente del sistema límbico, área preóptica (POA), hipotálamo posterior y núcleos del tallo cerebral, como locus cerúleo (LC), núcleos del rafe y área ventral tegmental (VTA) (figura 4)<sup>38,39</sup>.

*Sistema límbico: amígdala y núcleo del lecho de la estría terminal (BNST).* El sistema orexinérgico recibe estímulos abundantes del sistema límbico, el cual está implicado en las emociones. La importancia de esto se manifiesta en la respuesta a estrés agudo, ya que se presenta una disminución en los efectos cardiovasculares y locomotores en ratones knockout (KO) para prepro-orexina (*HCRT*)<sup>40</sup> y en modelos de ablación de OXN<sup>41</sup> al exponerse a estímulos estresantes emocionales.

*Área preóptica: núcleo preóptico ventrolateral (VLPO) y núcleo preóptico medial.* Esta área juega un papel crucial en la iniciación y mantenimiento del sueño NREM. Algunas neuronas de VLPO son neuronas activas durante el sueño y emiten proyecciones de GABA y galanina hacia LC, núcleo tuberomamilar (TMN) y rafe dorsal (DR)<sup>42,43</sup>, e inhiben a las OXN durante el sueño<sup>38,39</sup>.

*Tallo cerebral.* El sistema orexinérgico inerva recíprocamente a los núcleos monoaminérgicos del tallo cerebral, como LC (noradrenérgico), DR (serotoninérgico) y VTA (dopaminérgico), los cuales inhiben a las OXN en un ciclo de retroalimentación negativa<sup>44</sup>. Esto se lleva a cabo por receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub>, los cuales hiperpolarizan a las OXN por medio de canales de calcio regulados por proteína G (GIRK)<sup>45-47</sup>.

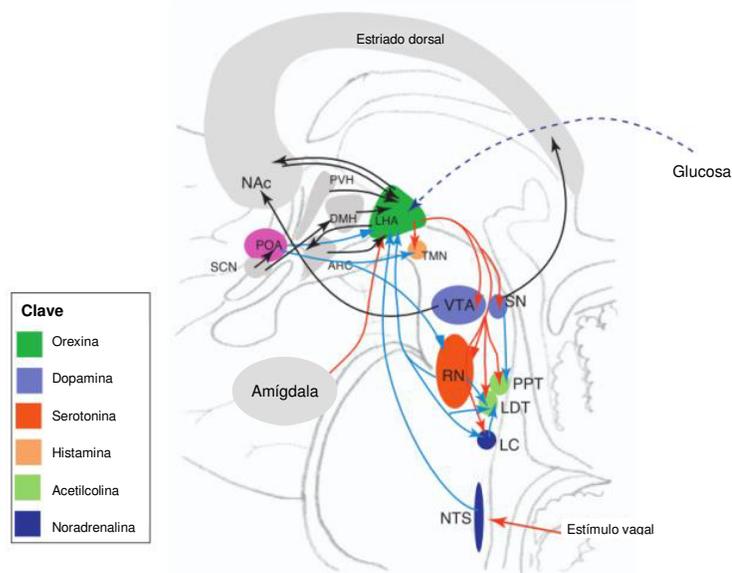
*Otros factores.* Existen otros factores que pueden regular la función de las neuronas orexinérgicas. Las orexinas pueden despolarizar a las mismas OXN en un ciclo de retroalimentación positiva a través del OXR-2<sup>46</sup>. La colecistocinina, neurotensina, oxitocina y vasopresina también despolarizan a las OXN <sup>48</sup>.

*Señales metabólicas.* Algunas señales metabólicas también regulan la función de las OXN. La baja en los niveles de glucosa produce despolarización e incremento en la frecuencia de descarga de OXN, mientras que los niveles elevados de glucosa producen el efecto opuesto<sup>49,50</sup>. La ghrelina despolariza a las OXN, mientras que la leptina produce hiperpolarización<sup>49</sup>. Este mecanismo de adaptación a los cambios en la disponibilidad de nutrientes lleva a la activación o inactivación de las OXN para fomentar la vigilia y reforzar las vías de búsqueda de alimento.

## **Eferencias**

Las OXN presentan eferencias distribuidas ampliamente en el sistema nervioso central (figura 4). Se han descrito en LC, núcleos septales, BNST, núcleo paraventricular (PVN) y núcleo reuniens del tálamo, zona incierta, núcleo subtalámico, sustancia gris central, sustancia negra, núcleos del rafe, área parabraquial, formación reticular medular y núcleo del tracto solitario. También se ha descrito en regiones corticales, núcleos amigdaloides central y anterior, y bulbo olfatorio, aunque con una densidad menor<sup>35</sup>.

La mayor densidad de fibras de OXN se encuentra en núcleos que promueven la vigilia: núcleo paraventricular del tálamo, núcleos arqueado (Arc) y tuberomamilar (TMN) del hipotálamo, los núcleos monoaminérgicos del tallo (LC, DR, VTA), y los núcleos colinérgicos del tallo (núcleo tegmental laterodorsal, o LDT, y núcleo pedunculopontino, o PPT)<sup>34,35</sup>.

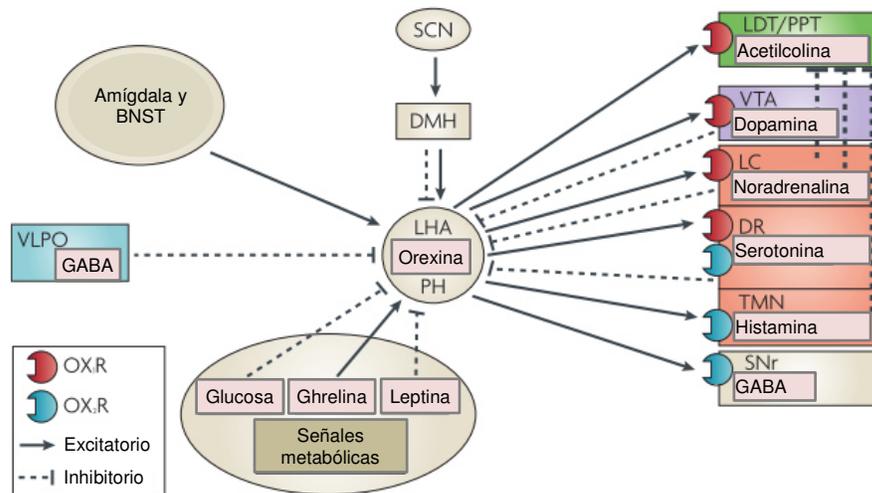


10

**Figura 4. Conexiones principales del sistema orexinérgico.**

Las neuronas de orexina presentan aferencias y eferencias con distintos grupos neuronales del sistema límbico y del tallo cerebral. LHA es sensible a niveles de glucosa por vía humoral, y tiene eferencias hacia vías dopaminérgicas (VTA, SN), serotoninérgicas (RN), histaminérgicas (TMN), colinérgicas (PPT, LDT) y noradrenérgicas (LC). A su vez, recibe estímulos de distintas regiones en el cerebro, como POA, RN, NTS, amígdala, DMH, NAc y PVH.

La expresión diferencial de los receptores orexinérgicos permite la regulación fina de los procesos asociados al sistema orexinérgico (figura 5).



**Figura 5. Expresión de los distintos receptores de orexinas de los distintos grupos neuronales.**

La comunicación de las neuronas de orexina con los diferentes grupos neuronales se lleva a cabo por diferentes tipos de receptores, OX1R (rojo) se expresa en LDT, VTA, LC y DR, mientras que el OX2R (azul) se expresa en DR, TMN y SNr. La amígdala y núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) producen estímulos excitatorios, y VLPO inhibe por vía de GABA a las neuronas de orexina. De las señales metabólicas, las OXN son inhibidas por glucosa y leptina, y estimuladas por ghrelina. VTA, LC y DR también inhiben a las OXN, y forman un ciclo de retroalimentación negativa.<sup>44</sup>

### **Órganos periféricos**

Se han encontrado receptores de orexinas en órganos periféricos, como en las glándulas suprarrenales<sup>51</sup>, gónadas, glándula pituitaria, riñón, tiroides y yeyuno<sup>52</sup>. Sin embargo, no se sabe el papel que desempeñan en estos sitios<sup>33</sup>.

## 2.5 Funciones

El sistema orexinérgico regula múltiples funciones vitales, como el ciclo sueño-vigilia, ingesta y equilibrio energético, motivación y respuesta a estrés, entre otros.

### **Ciclo sueño-vigilia**

La vigilia es un espectro de estados de comportamiento durante los cuales los animales exhiben activación motora voluntaria y responden a estímulos internos y externos. Al entrar a sueño, la consciencia se desvanece, y al avanzar a las etapas más profundas, se bloquean los estímulos sensoriales<sup>6</sup>.

El sueño es un proceso cíclico, el cual se lleva a cabo por alternación entre sueño de movimientos oculares rápidos (REM) y sueño no-REM (NREM). El sueño NREM se divide en cuatro etapas: las etapas 1 y 2 presentan umbrales de excitación bajos, por lo que se les considera sueño ligero, mientras que las etapas 3 y 4 presentan umbrales altos y se les considera sueño profundo<sup>10</sup>. El sueño REM se presenta con movimientos oculares rápidos y bajo tono muscular<sup>10</sup>. Durante sueño REM, es común presentar sueños vívidos y emocionales, acompañados de movimientos oculares rápidos y fluctuaciones en frecuencia cardíaca y respiratoria<sup>6</sup>.

En una noche típica, un humano adulto entra rápidamente a sueño NREM profundo y después cicla entre sueño REM y NREM aproximadamente cada 90 minutos. Al avanzar la noche, los sueños NREM se vuelven más ligeros y los episodios REM se vuelven más largos<sup>6</sup>.

El sistema orexinérgico es importante para mantener periodos largos de vigilia. Se detecta una alta actividad neuronal y altos niveles extracelulares de orexina-A durante el periodo activo, especialmente durante periodos de actividad locomotora elevada<sup>53,54</sup>. Las OXN disparan durante vigilia activa, disminuyen su ritmo de descarga durante vigilia de baja actividad, y cesan virtualmente durante sueño REM y NREM<sup>53,55</sup>

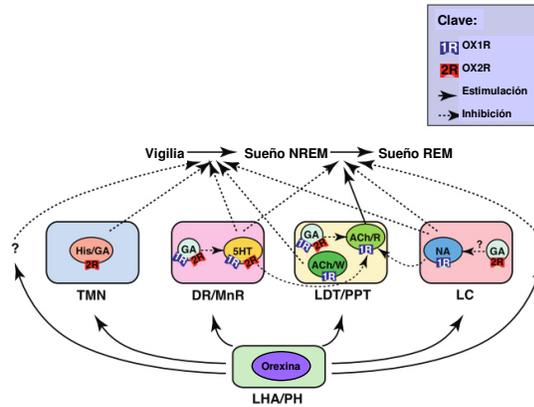
El estímulo de las neuronas de orexina incrementa el ritmo de disparo de las neuronas monoaminérgicas (LC, VTA, DR y TMN). Estos grupos suelen despolarizarse de manera tónica durante el periodo de vigilia, en un menor grado durante sueño NREM

y cesan en sueño REM<sup>10</sup>. Los núcleos monoaminérgicos del tallo inervan al prosencéfalo y sus proyecciones están involucradas en el sistema activador reticular ascendente (ARAS), el cual es el mecanismo efector de la función cortical, desincronizando a las neuronas corticales durante la vigilia<sup>10</sup>.

Las orexinas tienen un efecto excitatorio directo en las neuronas colinérgicas del tallo cerebral (de LDT y PPT), el cual está implicado en el mantenimiento de la atención y del estado de excitación<sup>56,57</sup>. Existen dos tipos de neuronas colinérgicas, dependiendo de su papel en el ciclo. Las neuronas activas durante vigilia y REM (W/REM-on) están implicadas en el mantenimiento de vigilia y sueño REM, y presentan receptores OXR-1<sup>10</sup> (figura 6). Las neuronas activas durante REM (REM-on) están implicadas en la desincronización de la corteza cerebral y atonía muscular durante REM<sup>10</sup>. En fase de vigilia, las neuronas REM-on son inactivadas por interneuronas GABAérgicas locales y de la sustancia negra, las cuales poseen ambos receptores de orexinas<sup>58</sup>. LC y DR ayudan a contrarrestar la activación de REM-on durante la vigilia<sup>44,59</sup>.

En cuanto a la expresión diferencial de receptores de orexina, se conoce que los receptores tipo 2 son más importantes en la promoción de la vigilia, ya que los ratones OXR-2 KO presentan ataques de sueño similar a los ratones KO para prepro-orexina<sup>60</sup>.

Los núcleos monoaminérgicos son inhibidos por estímulos del área preóptica, especialmente el VLPO. Durante el sueño, las neuronas del VLPO se activan por sustancias del sueño como adenosina<sup>61,62</sup>. Estas neuronas también envían proyecciones inhibitorias a las OXN<sup>39,63</sup>. Mientras que las OXN aceleran la función del ARAS, el área preóptica es un desacelerador del ARAS.



**Figura 6. Regulación de las fases de sueño REM y NREM.**

Las neuronas de orexina regulan a través de los núcleos el tallo cerebral, las distintas fases del sueño, REM o NREM, y ésta depende la expresión diferencial de los receptores de orexina en las neuronas monoaminérgicas o catecolaminérgicas (estimulantes) y gabaérgicas (inhibitorias).<sup>10</sup>

## Alimentación y homeostasis de energía

Las orexinas promueven la ingesta. En roedores, la inyección intracerebroventricular (ICV) de orexinas induce comportamiento de alimentación<sup>64-66</sup>, mientras que la administración ICV de anticuerpo anti-orexina y los antagonistas de OXR-1 reduce la ingesta<sup>66,67</sup>. Cuando en un organismo disminuye la reserva energética, se incrementa el ritmo de disparo de OXN para mantener vigilia y fomentar la búsqueda de alimento.

Los ratones con ablación de OXN tienen un fenotipo de obesidad de inicio tardío e hipofagia<sup>15,68</sup>, y esto también se observa en personas con narcolepsia<sup>69,70</sup>. A pesar de que las orexinas promueven la ingesta, también promueven la actividad y el gasto basal de energía. Por este motivo, los narcolépticos presentan incremento en índice de masa corporal a pesar de la hipofagia.

Durante el ayuno, la expresión de orexina incrementa<sup>4</sup>, mediado por el factor de transcripción Foxa2, el cual se desplaza al núcleo, y se une al promotor de orexina, estimulando la transcripción de *HCRT*<sup>71</sup>.

El núcleo arqueado (Arc) está innervado densamente por OXN, y se cree que el mecanismo de incremento en la ingesta por orexinas es mediado por activación de neuronas de neuropéptido Y (NPY) en Arc<sup>30,72</sup>. En la promoción de la ingesta por

orexinas, también hay una inhibición de las neuronas de proopiomelanocortina (POMC) en Arc, las cuales juegan un papel en la inhibición de la ingesta mediada por leptina<sup>30</sup>.

La inhibición del núcleo accumbens (NAc) promueve la ingesta. Las orexinas inhiben a la corteza del núcleo accumbens, induciendo la ingesta de alimento<sup>73</sup>, y a su vez, la inhibición del núcleo accumbens resulta en la activación de las OXN en un ciclo de retroalimentación<sup>74</sup>.

### **Motivación y recompensa**

La activación de OXN está ligada fuertemente a las señales asociadas a recompensa<sup>75</sup>. En roedores, las infusiones de orexinas por vía ICV o directamente en VTA restauran comportamiento de búsqueda de drogas y alimentos<sup>75,76</sup>, mientras que la administración de antagonistas de OXR-1 resulta en menor actividad de búsqueda de alimento<sup>77</sup>, etanol<sup>78</sup> y nicotina<sup>79</sup>. Se cree que este efecto se da por activación de la vía de fosfolipasa C y por translocación de receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA) a la membrana postsináptica de las neuronas dopaminérgicas de VTA<sup>80</sup>.

Los antagonistas de orexinas pueden neutralizar los comportamientos adictivos asociados a morfina y cocaína<sup>80,81</sup>. Estos hallazgos resaltan el papel de orexina en la plasticidad neuronal asociada a recompensa en el VTA e indica que las orexinas contribuyen a la búsqueda de recompensa inducida por drogas<sup>10</sup>.

Los pacientes con narcolepsia raras veces desarrollan adicción, a pesar de utilizar fármacos con potencial adictivo durante períodos prolongados<sup>82</sup>.

Se ha encontrado que las orexinas juegan un papel en la motivación sexual en roedores. Las OXN se activan al exponerse a señales que indican recompensa sexual en ratas macho<sup>83</sup>, y la administración de orexina-A en el área preóptica medial incrementa el desempeño copulatorio<sup>84</sup>.

### **Respuesta a estrés**

Las OXN se activan en situaciones de estrés<sup>85-87</sup>, y ratones deficientes de orexina presentan una respuesta atenuada al estrés<sup>40</sup>.

El sistema orexinérgico está relacionado estrechamente con el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal. Los niveles de orexina en líquido cefalorraquídeo (LCR) se correlacionan positivamente con los de la hormona liberadora de corticotropina (CRH)<sup>88</sup>. En experimentos con modelos murinos también se ha podido evidenciar esta relación. Al someter a ratas a estrés, se observa un incremento en niveles de orexina en LCR, y un peor desempeño en pruebas conductuales, efecto que se revierte al administrar antagonistas de orexina<sup>89</sup>. A su vez, la administración de orexinas resulta en un incremento de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y corticosterona<sup>90</sup>.

Las neuronas de orexina, al igual que la fracción parvocelular del núcleo paraventricular (pPVN) del hipotálamo, se activan bajo estrés, y la inactivación de las OXN resulta en una disminución de la activación del pPVN<sup>89</sup>. Además, se ha descrito que el receptor de glucocorticoides regula la expresión de prepro-orexina de manera positiva<sup>89</sup>.

Las orexinas también juegan un papel en la activación del sistema simpático. La inyección ICV de orexina incrementa los efectos del sistema simpático, como aumento en la presión arterial y la frecuencia cardíaca, y estos efectos se neutralizan al administrar antagonistas de receptores adrenérgicos<sup>91</sup>. El sistema orexinérgico estimula la utilización de glucosa asociada a ingesta en músculo esquelético por activación del sistema simpático a través del núcleo ventromedial del hipotálamo<sup>92</sup>.

## **Nocicepción**

El nivel de vigilia es uno de los principales factores que afectan nocicepción y dolor. La analgesia inducida por estrés promueve la supervivencia de un animal al permitir las respuestas de defensa contra depredadores o rivales<sup>93</sup>. Las OXN inervan sitios relacionados con nocicepción: LC y sustancia gris periacueductal (PAG). Los estímulos dolorosos activan a las OXN, y la activación de OXN induce analgesia<sup>94,95</sup>.

## 2.6 Patologías asociadas

### **Narcolepsia**

La importancia del sistema orexinérgico se evidencia en la narcolepsia, un trastorno del sueño causado por pérdida selectiva de neuronas productoras de orexina<sup>6</sup>. La narcolepsia se caracteriza por desorganización del ciclo sueño-vigilia, con somnolencia diurna excesiva, cataplexia, alteraciones en la cantidad y en la instauración de la fase de sueño de movimientos oculares rápidos (REM), y alucinaciones hipnagógicas/hipnopómpicas<sup>15</sup>. Aunque en México no existen datos epidemiológicos al respecto, se estima una prevalencia global de 25 a 50 sujetos por cada 100,000 personas<sup>96</sup>.

Se asoció por primera vez la falla del sistema orexinérgico con esta patología en 1999, cuando Lin y colaboradores descubrieron que la narcolepsia canina se debe a una mutación del gen *Hcrtr2*, el cual codifica el receptor de orexina tipo 2<sup>97</sup>. En el humano, se cree que la patogénesis de la enfermedad es de naturaleza autoinmune, ya que se destruyen selectivamente las neuronas de orexina con preservación de otros grupos celulares del hipotálamo lateral, y gliosis limitada a esa región<sup>7</sup>. Además, se asocia a polimorfismos en el antígenos leucocitarios humanos, como HLA DQB1\*0602 y DQA1\*0102<sup>15</sup>.

La cataplexia es una condición que se caracteriza por episodios de pérdida de función muscular, desde debilidad hasta un colapso total, y suele acompañar a la narcolepsia<sup>10</sup>. El sistema límbico está implicado en la patofisiología de la cataplexia: los estímulos emocionales positivos la desencadenan<sup>98</sup>. De manera fisiológica, durante la fase REM del sueño, las neuronas colinérgicas del núcleo pedunculopontino (PPT) promueven atonía<sup>99</sup>. En la vigilia, el estímulo orexinérgico en el PPT previene la atonía. Esta vía está alterada en la narcolepsia, por lo que ocurren los episodios de cataplexia.

### **Ansiedad**

Las orexinas incrementan el comportamiento relacionado a estrés<sup>100</sup> y están alteradas en sujetos con ansiedad<sup>33</sup>. En el trastorno de estrés post-traumático, los niveles están disminuidos y se correlacionan negativamente con la severidad clínica<sup>101</sup>.

## **Depresión**

Los trastornos del sueño están relacionados con los trastornos afectivos. La depresión se suele presentar con alteraciones en el ciclo del sueño<sup>102</sup>, y la narcolepsia se asocia con depresión secundaria<sup>103</sup>.

En la depresión, los niveles de orexinas se encuentran alterados<sup>104</sup>. En un estudio, se midieron niveles de orexina-A en LCR, y se encontró que están elevados en sujetos con depresión. Estos niveles disminuyen bajo tratamiento con sertralina (un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina), lo cual indica que este efecto pudiera estar mediado por el sistema serotoninérgico<sup>105</sup>.

## **Trastornos alimenticios**

La anorexia nerviosa es un trastorno mental caracterizado por una disminución en el apetito, pérdida de peso severa y expectativas patológicas de un cuerpo delgado. No se conocen los mecanismos fisiopatológicos, pero se sabe que los sistemas serotoninérgicos y dopaminérgicos están involucrados<sup>33</sup>. En un estudio, se encontró una correlación negativa entre niveles de OXA y severidad de anorexia nerviosa<sup>106</sup>, sin embargo, no se conoce la relación causal entre éstos.

## *2.7 Terapias dirigidas al sistema orexinérgico*

Desde el descubrimiento del sistema orexinérgico, se ha investigado su uso potencial para tratar enfermedades relacionadas con el mismo. Se han desarrollado agentes para uso en investigación, y uno de ellos ha sido aprobado por la FDA para uso como terapia, el suvorexant.

Los agonistas de receptores de orexina pueden ser eficaces para el tratamiento de narcolepsia y otras condiciones que se presentan con somnolencia diurna excesiva<sup>10</sup>. Sin embargo, debido a que las orexinas son de naturaleza peptídica y no atraviesan la barrera hematoencefálica de forma eficiente<sup>107</sup>, hay un interés por desarrollar agonistas de receptor de orexina que puedan llegar a sus receptores en el sistema nervioso central. Recientemente, se han desarrollado agonistas no peptídicos del OXR-2 para el tratamiento de narcolepsia<sup>108</sup>, y se ha demostrado su eficacia en disminuir los síntomas en modelos murinos<sup>109</sup>.

Los antagonistas de receptores de orexina se han investigado con el objetivo de ofrecer un tratamiento a personas con obesidad o insomnio<sup>10</sup>. En 2001, Porter y colaboradores sintetizaron el primer antagonista no peptídico de OXR-1: SB-334867<sup>110</sup>. Posterior a esto, se han propuesto otros antagonistas de receptores de orexinas, selectivos (antagonistas sencillo de receptor de orexina, SORA) y no selectivos (antagonista dual de receptores de orexina, DORA) en estudios preclínicos con resultados prometedores. Para el tratamiento del insomnio, se desarrolló almorexant, un DORA no competitivo, el cual llegó a fase III de ensayos clínicos<sup>111</sup>, pero se detuvo su desarrollo en 2011. En 2010, se desarrolló suvorexant para el tratamiento de insomnio<sup>112</sup>. Este agente mejora la consolidación del sueño y suele ser bien tolerado. Fue aprobado por la FDA en 2014 para el tratamiento de insomnio. Otro DORA, llamado filorexant, se descubrió en 2012 y se encuentra en fase clínica, con resultados alentadores<sup>113</sup>.

La terapia génica parece una estrategia prometedora para el tratamiento de narcolepsia, aunque aún quedan problemas por resolver<sup>33</sup>. En 2004, Mieda et al.,

administraron el gen *HCRT* en ratones modelo de narcolepsia, y se observó una reversión de los síntomas<sup>114</sup>. También se ha demostrado que disminuyen los episodios de cataplexia al administrar el gen *HCRT* en LH y zona incierta<sup>115</sup>, y en la amígdala<sup>116</sup> en ratones modelo de narcolepsia. También se ha realizado la transfección de *HCRT* en puente dorsolateral e hipotálamo mediobasal, incrementando el estado de vigilia y normalizando el sueño en un modelo ratón de narcolepsia<sup>117,118</sup>

La terapia basada en células es otra herramienta que se encuentra en investigación activa para el tratamiento de estas enfermedades. En un estudio en ratas, se realizó un trasplante bilateral de neuronas de orexina en LH, y se vio una reversión del fenotipo narcoléptico<sup>119</sup>. Sin embargo, aún existen obstáculos por vencer, como la baja eficacia de supervivencia de células trasplantadas y la seguridad del procedimiento<sup>33</sup>.

## 2.8 Aspectos del desarrollo

El hipotálamo se desarrolla a partir del primordio hipotalámico en el diencéfalo rostral, por inducción de la placa precordial subyacente. Después de la inducción, se genera un patrón espacial en el hipotálamo, que lo divide en tres ejes que definen las áreas hipotalámicas<sup>120</sup>.

En el humano, a partir de las 9-10 semanas de gestación, inicia el desarrollo hipotalámico con proliferación celular en la zona germinal ventricular adyacente a la pared del tercer ventrículo. A esto le sigue la formación de neuroblastos (células postmitóticas) externos a la capa germinal. Las células postmitóticas se acumulan y agregan en núcleos (grupos compactos) o áreas (poblaciones dispersas) por mecanismos que no se conocen por completo. La última etapa de diferenciación neuronal comprende la de mielinización y formación de conexiones<sup>121</sup>.

En la semana 9, el hipotálamo fetal muestra mínima diferenciación de sus núcleos. Las células positivas a calretinina aparecen en la semana 13. La calretinina es un marcador de diferenciación del área lateral hipotalámica, siendo la primera estructura hipotalámica que presenta diferenciación. Para la semana 18, la zona lateral del hipotálamo presenta estructuras bien diferenciadas, incluyendo LHA, núcleo tuberal lateral (LTu), área hipotalámica posterior (PH) y núcleo hipotalámico perifornical (PeF)<sup>121</sup>.

Los niveles de orexina en LCR se pueden detectar desde el tercer trimestre del embarazo y aumentan de forma lineal. Los niveles llegan a un máximo a los 2-4 meses de edad. Esto coincide con la edad de consolidación de estado sueño-alerta, el cual está regulado por la hipocretina<sup>122</sup>

### **Desarrollo en modelo murino**

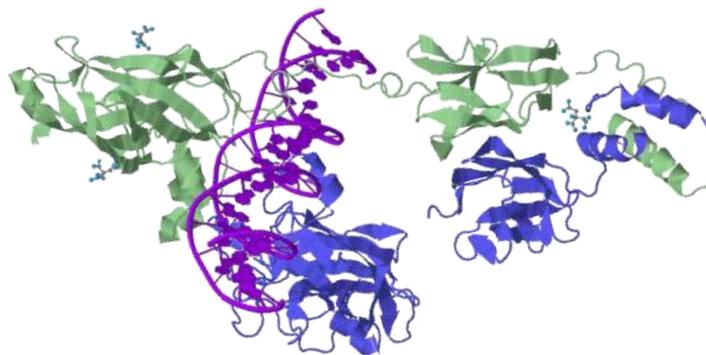
La gestación en el ratón doméstico (*Mus musculus*) tiene una duración de 18 días. En el día embrionario 1 (E1), también expresado como día post-coito 1 (dpc 1), ocurre la fertilización. La actividad del promotor de orexina se detecta desde el día E12 y el péptido orexina A se detecta hasta el día E14 por inmunofluorescencia<sup>9</sup>. Para el día post-natal 7 (P7), el número de neuronas orexinérgicas es igual al del adulto, y se presenta una madurez electrofisiológica de las OXN el día P21<sup>9</sup>.

### 3. Factor de células B tempranas 2 - *EBF2*

#### 3.1 Generalidades

EBF2 (factor de células B tempranas 2), también conocido como COE2, O/E-3 y Mmot1, es un factor de transcripción perteneciente a la familia de factores de transcripción EBF (por sus siglas en inglés Early B-Cell Factor). El primer miembro de esta familia, EBF1, fue descrito en 1991, al detectar que existía un factor que interaccionaba con el promotor del gen *mb-1* (*Cd79a*) en linfocitos B tempranos<sup>123</sup>. Otro grupo de investigación describió un factor presente en un extracto de epitelio olfatorio, el cual podía regular la expresión del gen OMP en el mismo tejido, y lo llamaron Olf-1, aunque se trataba de la misma proteína<sup>124</sup>.

Los miembros de esta familia de factores de transcripción pertenecen al grupo de factores con dominio hélice-bucle-hélice (HLH) atípico, y suelen formar homodímeros o heterodímeros<sup>125</sup> (figura 7). Tienen dos dominios importantes: un dominio de dimerización, con un motivo hélice-bucle-hélice atípico, y un dominio de unión a ADN n-terminal, con un motivo en dedo de zinc<sup>125,126</sup>. Reconocen la secuencia palindrómica 5'-ATTCCCNNGGGAAT<sup>125,127</sup>.



**Figura 7. Modelo de un dímero de Ebf1, parálogo de Ebf2.**

Cada monómero se representa con un color distinto, verde y azul, mientras que el ADN está representado de color magenta. En el lado izquierdo de la imagen, se observa el dominio de unión a ADN, y en el lado derecho, se observa el dominio de dimerización. (PDB: 10.2210/pdb3mlp/pdb)<sup>128</sup>

### *3.2 Función y localización*

Se sabe que EBF2 está involucrado en el desarrollo de diferentes tejidos del organismo, en etapa embrionaria o postnatal.

A nivel de sistema nervioso periférico, se involucra en la mielinización y en la diferenciación de células de Schwann, y en el desarrollo de las neuronas motoras<sup>129,130</sup>.

En el sistema nervioso central, juega un papel en el desarrollo de varias regiones. En corteza cerebral regula el desarrollo y la migración de las células Cajal-Retzius<sup>131,132</sup>. En cerebelo, regula la formación del patrón cerebelar, y la diferenciación y migración de células de Purkinje<sup>133-136</sup>. En hipotálamo, regula la migración de neuronas GnRH<sup>129</sup> y el desarrollo de neuronas de orexina<sup>8</sup>. Además, regula a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia gris periacueductal<sup>137</sup> y la proyección dorsal de las neuronas receptoras olfatorias al bulbo olfatorio<sup>138</sup>.

Fuera del sistema nervioso, está involucrado en el desarrollo de células madre hematopoyéticas<sup>139</sup>, desarrollo de extremidades<sup>140</sup>, diferenciación de osteoclastos<sup>141</sup>, adipogénesis blanca<sup>142</sup> y adipogénesis parda<sup>143,144</sup>. En el adulto, se sigue expresando en cerebelo, músculo, corazón, ovario, testículos, y con baja expresión en cerebro, timo, riñón, hígado, bazo e intestino<sup>126</sup>.

### *3.3 Desarrollo en el modelo de ratón*

Lo más temprano que se describe el inicio de detección de EBF2 en tejidos embrionarios es en el día E9, en los arcos branquiales primero y segundo<sup>141</sup>. A nivel del sistema nervioso en formación, se ha descrito su expresión desde E9.5 en diencéfalo y rombencéfalo<sup>145</sup>. En E12.5, se detecta una señal débil en área preóptica y región mamilar del hipotálamo<sup>126</sup>. Sin embargo, no se ha descrito de manera específica la presencia de células positivas para EBF en el hipotálamo lateral, donde se encuentran las neuronas orexinérgicas.

## II. ANTECEDENTES

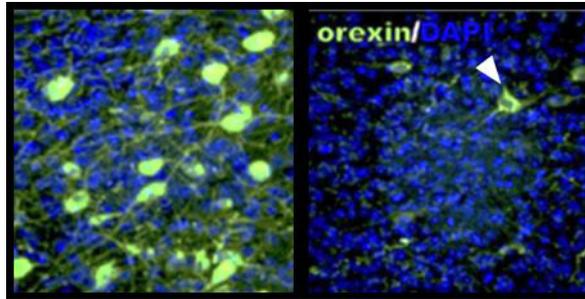
### 1. Honda, Mignot y colaboradores (2009)

En 2009, Honda y colaboradores<sup>146</sup> realizaron un estudio de transcriptoma por microarreglos, utilizando muestras de hipotálamo posterior de cerebros narcolépticos humanos (vs. control) y ratones modelo de ablación de neuronas de hipocretina orexina/ataxina-3 vs. silvestre. Se encontró un panel amplio de genes diferencialmente expresados. En el ensayo con modelo murino se encontró que *Ebf2* se encuentra disminuido en ratones modelo en el área perifornical (1/fold change = 2.6), entre otros genes. Sin embargo, la expresión de este gen no se validó por otros métodos.

### 2. De la Herrán, Vidaltamayo y colaboradores (2011)

Como antecedente de nuestro grupo de trabajo, en 2011 De la Herrán y colaboradores<sup>8</sup> generaron ratones knock-out para *Ebf2*, y analizaron el fenotipo a través de análisis de actividad locomotora, electroencefalografía, electromiografía y análisis morfológico por inmunofluorescencia con marcaje para orexina A y acetilcolina.

Los ratones transgénicos presentaron episodios de cese abrupto de actividad motora voluntaria. En la electroencefalografía se evidenciaron episodios de transición directa de vigilia a sueño REM (DREM), latencia REM más corta y sueño no-REM (NREM) fragmentado, a diferencia de los ratones silvestres. Estos datos indican un fenotipo narcoléptico. En el ensayo de inmunofluorescencia, hubo una disminución de 80% en el número de células productoras de orexina en el hipotálamo lateral (figura 8), y una disminución en la innervación orexinérgica en la formación reticular del puente.



**Figura 8. Inmunofluorescencia en ratones Ebf-null.**

En el lado izquierdo de la imagen, se presenta una la inmunofluorescencia de los ratones silvestres, con la orexina-A marcada de color verde. En el lado derecho se presenta el marcaje de orexina-A (verde) en ratones KO para *Ebf2*.

En la discusión del artículo, se presentó un análisis bioinformático de la secuencia del promotor de orexina en donde se encontraron sitios de posible unión de EBF2 (figura 9).



**Figura 9. Alineamiento de promotor de *Hert***

En esta imagen se presenta el alineamiento de un fragmento del promotor de orexina, proximal al inicio del sitio de la transcripción (marcado con una flecha). Se detectó una caja TATA (marcada con una caja negra) y dos sitios olf-1 (en negritas). Estos sitios olf-1 se conservan en las especies de mamíferos analizados. <sup>8</sup>

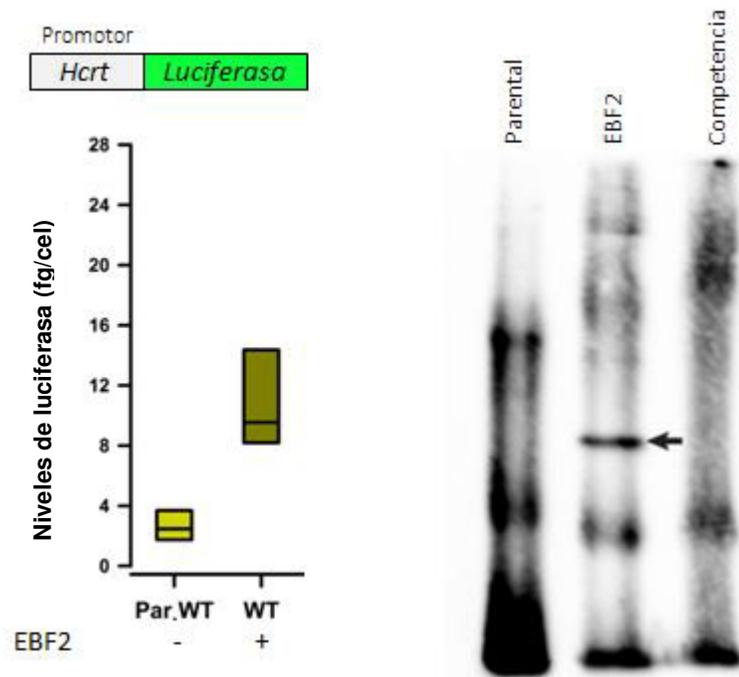
Este estudio evidencia la importancia de EBF2 en el desarrollo de neuronas orexinérgicas y en el establecimiento de circuitos orexinérgicos funcionales al controlar la expresión de orexina y el desarrollo correcto de las fibras nerviosas hipotalámicas.

### 3. Sánchez, Vidaltamayo y colaboradores (2017)

En 2017, Sánchez y colaboradores, parte de nuestro grupo de trabajo, realizaron un estudio para analizar el papel de EBF2 en la regulación de expresión de orexina *in*

*vitro*<sup>147</sup>. Por métodos bioinformáticos, presentados en el antecedente previo, se detectaron dos sitios posibles de unión a EBF2 (sitios Olf-1) en el promotor de *Hcrt*.

Se realizó un ensayo de gen reportero luciferasa de un promotor mínimo de *Hcrt* murino en línea HEK293 de riñón embrionario humano, en el cual se pudo evidenciar la expresión del gen reportero (figura 10). Al inducir la expresión de EBF2 en las células, se incrementaba la señal del gen reportero. Además, se realizó un ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA), y se evidenció que EBF2 se une directamente al promotor de orexina, produciendo un retardo del oligonucleótido marcado.



**Figura 10. Resultado de ensayo de gen reportero luciferasa y EMSA.**

En el lado izquierdo se presenta el resultado de la prueba de gen reportero luciferasa, en el cual se obtuvo como resultado que el promotor de *Hcrt* incrementa su actividad en presencia de EBF2. La imagen del lado derecho es el resultado del ensayo EMSA, en el cual se evidencia que en presencia de EBF2 ocurre un retardo del oligonucleótido del promotor.

Este estudio provee evidencia de que el papel de EBF2 en el desarrollo del sistema orexinérgico puede deberse a la regulación directa del gen de prepro-orexina. Sin embargo, no hay reportes que indiquen que EBF2 se expresa en neuronas orexinérgicas.

### **III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Las neuronas orexinérgicas del ratón o alguna población del hipotálamo lateral expresan el factor de transcripción EBF2 en alguna etapa?

### **IV. JUSTIFICACIÓN**

El sistema orexinérgico juega un papel importante en la regulación del sueño y en la ingesta, y la disfunción de este sistema resulta en múltiples enfermedades.

Existe un interés por comprender los elementos moleculares clave en la regulación de la orexina, ya que podrían ayudar a definir dianas para el tratamiento de estas enfermedades.

Aunque existe evidencia de que hay una interrelación en la expresión de *EBF2* y de *HCRT*, es necesario conocer si este factor de transcripción se expresa en hipotálamo, y en particular en las neuronas de orexina.

### **V. HIPÓTESIS**

El factor de transcripción EBF2 es expresado por neuronas de orexina, o por alguna población neuronal del hipotálamo lateral relacionada estrechamente en la etapa adulta, o en alguna etapa del desarrollo embrionario en *Mus musculus*.

## **VI. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Definir el patrón de expresión de *Ebf2* en el desarrollo del hipotálamo lateral en el modelo *Mus musculus*, y conocer su relación con las neuronas de orexina.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar si las neuronas de orexina producen EBF2 en el ratón adulto.
2. Determinar si otras poblaciones neuronales del hipotálamo lateral producen EBF2.
3. Analizar la presencia de EBF2 durante el desarrollo embrionario en las neuronas de orexina.

## VII. METODOLOGÍA

### Estrategia general

En este trabajo se buscó analizar la presencia de EBF2 en las neuronas orexinérgicas de ratones en la etapa adulta y en el desarrollo embrionario, y determinar si se expresa en otra población del hipotálamo lateral que forme un circuito local con las neuronas de orexina. Por lo tanto, la estrategia general consistió en estandarizar las técnicas con ratones adultos de la cepa C57BL/6, de los cuales, se obtuvo el cerebro, se preparó para criosección, se realizaron cortes coronales de 16  $\mu\text{m}$  y se lleva a cabo inmunofluorescencia de doble marcaje. Una vez estandarizado, se procedió a generar cruces de ratones e interrumpir la gestación en la edad embrionaria a estudiar (E15.0-E17.0).

### Modelo de estudio

Se estudió el ratón doméstico (*Mus musculus*), cepa C57BL/6, en etapa adulta (7-9 semanas de edad, 20 g de peso, ambos sexos) y en etapas embrionarias E14.0, E15.0 y E17.0.

### 1. Obtención de cerebros adultos

#### Materiales

- PBS 1X, helado
- Formaldehído a 4% en PBS 1X, helado

En ratones adultos, se realizó la eutanasia con pentobarbital en dosis letal (250 mg/kg) por vía intraperitoneal. Al confirmar la ausencia de reflejo pedal a un estímulo doloroso, se procedió a realizar laparotomía y toracotomía. Al localizar el corazón, se cateterizó el ventrículo izquierdo y se seccionó la vena cava inferior. Se realizó perfusión por el ventrículo izquierdo con PBS 1X (20 ml), permitiendo la exsanguinación, la cual se puede verificar al observar palidez de tejidos. Posterior a la perfusión con PBS, se perfundió con formaldehído a 4% (20 ml) y luego con PBS 1X nuevamente (20 ml). Se decapitó y se realizó disección para obtener el cerebro del ratón.

## **2. Preparación de tejido**

### Materiales

- Formaldehído 4% en PBS 1X
- Solución de sacarosa a 30% en PBS 1X

Se transfirió el cerebro extraído a un tubo con formaldehído a 4% para post-fijación por la noche. Al día siguiente, se retiró la solución de formaldehído y se realizaron 5 lavados con 50 ml de PBS durante 5 minutos cada uno. Se retiró el PBS y se colocó el tejido en 30 ml de solución de sacarosa a 30% en PBS 1X. Una vez que el tejido se precipitó en el fondo del recipiente, se procedió a la criosección del mismo.

## **3. Criosección**

### Materiales

- Medio OCT (Tissue-Tek)
- Laminillas cargadas SuperFrost Plus (EMS)

Se congeló el tejido en el medio de inclusión OCT (Tissue-Tek) en la placa de congelamiento del criostato. Se realizan cortes coronales de 16  $\mu\text{m}$ , abarcando hipotálamo lateral (Bregma 0.02 – -2.92 mm). Se colocaron los cortes en laminillas con carga positiva (EMS SuperFrost Plus) y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Para el control positivo de EBF2, se analizaron cortes coronales de rostro para visualizar epitelio olfatorio. Previo a su sección, este tejido se descalcificó al exponerse a EDTA en la fase de crioprotección.

Las soluciones mencionadas se prepararon de la siguiente manera:

*Formaldehído a 4%*. Para preparar 50 ml de solución, se llena un tubo de 50 ml con PBS. Se somete a calentamiento en horno de microondas durante 30 segundos o antes de llegar a ebullición y se le agregan dos gotas de NaOH 1M. En otro tubo, se miden 2 g de paraformaldehído y en éste se vierte el PBS caliente. Se mezcla por agitación y se ajusta

el pH a 7.4. Se filtra con un filtro de polisulfona con poros de 0.2  $\mu\text{m}$ . Se deja enfriar en hielo.

*Solución de sacarosa a 30%*. Se llena un frasco de 1 L con 300 g de sacarosa. Se afora a 1 L con PBS 1X. Se disuelve por agitación en calor y se esteriliza en autoclave.

*Solución PBS/EDTA*. Se mezcla en proporción 1:1 una solución PBS 2X y una solución EDTA 500 mM pH 8.

#### **4. Inmunofluorescencia**

##### Materiales

- Anticuerpos primarios
- Anticuerpos secundarios
- Suero normal de burro (Jackson ImmunoResearch: 017-000-121)
- Solución salina tamponada con Tris (TBS)
- Solución tamponada de citrato de sodio, pH 6
- Tween 20
- Triton X-100
- Medio de montaje FluoroGel II con DAPI (EMS)
- Tyramide Superboost Kit with Alexa Fluor 555, Invitrogen (B40923)
- Cubreobjetos de silicato GOLD SEAL®
- Cámara de Coplin
- Cámara de humedad para inmunotinción

Para la técnica de inmunofluorescencia, se buscó analizar la colocación de EBF2 con cada uno de los marcadores de poblaciones de hipotálamo lateral contempladas. Para ello, se estandarizó el ensayo hasta obtener una señal clara de presencia del antígeno de interés en cerebros de ratones adultos. En esta fase de estandarización, se realizaron ensayos con el rango de concentraciones recomendadas por el fabricante y se tomó en cuenta la dilución en la que se obtuviera la mejor señal con el menor ruido de fondo. En los anticuerpos cuya señal no se logró observar satisfactoriamente con la

máxima concentración recomendada, se procedió a realizar recuperación de antígeno y amplificación de señal por tiramida.

Se tomó como control positivo el hipotálamo lateral para los somas de las neuronas de las distintas poblaciones. Para EBF2, se utilizará como control positivo el epitelio olfatorio. Con estos tejidos se procedió a estandarizar.

Se analizó 1 de cada 10 cortes de hipotálamo lateral en los cerebros de ratones adultos, y 1 de cada 6 cortes en cerebros de embriones.

#### Anticuerpos primarios

<b>Diana</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Catálogo</b>	<b>Dilución</b>
EBF2	Oveja	R&D Systems	AF7006	1:200
Orexina-A	Conejo	Phoenix Pharmaceuticals	H-003-30	1:500
Orexina-B	Conejo	Phoenix Pharmaceuticals	H-003-32	1:500
MCH	Conejo	Phoenix Pharmaceuticals	H-070-47	1:500
CART	Conejo	Phoenix Pharmaceuticals	H-003-61	1:500
Neuropéptido Y	Conejo	Phoenix Pharmaceuticals	H-049-03	1:500
Neurotensina	Conejo	Phoenix Pharmaceuticals	H-048-03	1:200
Prepro-neurotensina	Conejo	Phoenix Pharmaceuticals	H-048-02	1:66
LepR	Cabra	R&D Systems	AF497	1:66

#### Anticuerpos secundarios

<b>Diana</b>	<b>Conjugado</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Catálogo</b>	<b>Dilución</b>
IgG de conejo	Alexa Fluor 594	Burro	Jackson ImmunoResearch	711-586-152	1:500
IgG de conejo	Alexa Fluor 488	Burro	Jackson ImmunoResearch	711-546-152	1:500
IgG de conejo	HRP	Burro	Jackson ImmunoResearch	711-036-152	1:500

IgG de oveja	Alexa Fluor 488	Burro	Jackson ImmunoResearch	713-546-147	1:500
IgG de oveja	Cy3	Burro	Jackson ImmunoResearch	713-166-147	1:500
IgG de cabra	Alexa Fluor 594	Burro	Jackson ImmunoResearch	705-586-147	1:500

*Atemperación.* Se incuban los cortes a 37°C durante 60 minutos.

*Recuperación de antígeno (opcional).* Se realizó la recuperación de antígeno con dos soluciones distintas para comparar resultados. Una es la solución de citrato de sodio pH 6.0 y la otra es Tris/EDTA pH 9.0. Se sumergen las laminillas en solución caliente (100°C) y se incuban a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente, se retiran del calor y se dejan llegar a temperatura ambiente. Ambas soluciones dieron resultados similares y se decidió trabajar con solución de citrato de sodio pH 6.0 por conveniencia.

*Bloqueo y permeabilización.* Se aplicaron 500 µl de solución de suero de burro a 5% en 0.25% Triton X-100 / TBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara de humedad para inmunotinción.

*Incubación con anticuerpos primarios.* Se realizó lavado en TBS + Tween 20 (0.1%) o TBST, en cámara de Coplin por 5 minutos. Se incubó con 100 µl de solución de anticuerpos primarios en cada laminilla (en su dilución óptima) por la noche a 4°C en la cámara de inmunotinción.

*Incubación con anticuerpos secundarios.* Se realizaron tres lavados con TBST durante 5 minutos. Se colocaron las laminillas en la cámara de inmunotinción y se les añadió 150 ul de solución de anticuerpos secundarios en TBST. Se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente.

*Montaje.* Se realizaron dos lavados con TBST durante cinco minutos, un lavado con TBS de cinco minutos. Se retiró el exceso de líquido, se les colocaron tres gotas de medio de montaje EMS Fluoro-Gel II con DAPI por laminilla y se extendieron hasta

cubrir todos los cortes. Finalmente, se colocó un cubreobjeto y se selló con barniz de uñas transparente.

Se observó bajo microscopio de fluorescencia (Axio Imager.Z1, Zeiss) y se analizó utilizando el software FIJI (ImageJ). En algunos casos, se contaron los somas positivos por corte de manera manual, y se estimó el total por cerebro multiplicando por diez (ya que se analizó uno de cada diez cortes).

En los casos donde no se obtuvo una señal de buena intensidad, se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP), a la cual se expone a un reactivo de tiramida conjugado con AF555.

Las soluciones mencionadas se prepararon de la siguiente manera:

*Solución salina tamponada con Tris (TBS).* Para 1 L, se llena un frasco con 1 L de agua destilada. Se añaden 6.057 g de Tris base y 8.76 g de NaCl y se disuelve por agitación. Se ajusta a pH 7.5 y se esteriliza en autoclave.

*Citrato de sodio, pH 6.* Se mezclan 2.94 g de tri-sodio citrato (dihidrato) en 1000 ml de agua destilada por agitación. Se ajusta a pH 6, y se esteriliza. Posteriormente, se le añaden 0.5 ml de Tween 20.

*Tris/EDTA, pH 9.* Se utiliza el reactivo de recuperación de Dako (10X) y se diluye a 1X en agua miliQ estéril.

## 5. Generación de embriones

Para obtener embriones de las etapas contempladas, primero se realizaron cruzas con datación. El día de la crua, se colocaron 4 hembras con un macho dominante antes del ciclo de oscuridad para el apareamiento. La mañana siguiente, se aislaron a las hembras del macho dominante y se tomó como día E0.5. Después de esto, no se volvieron a exponer a ratones machos y estuvieron bajo observación hasta cumplir los 13 días. Si presentaban datos de gestación como incremento significativo de volumen o peso, se tomaron en cuenta para el sacrificio.

Para incrementar la probabilidad de apareamiento y gestación, previo al apareamiento se buscó sincronizar a las ratonas hembra por medio del efecto Lee-Boot, el cual consiste en aislar a las hembras de feromonas masculinas para inducir una fase de anestro. Posteriormente, se expusieron a las hembras a feromonas masculinas (cama utilizada de macho) por 48 horas antes de la cruce para inducir fase de estro (efecto Whitten).

La etapa embrionaria se confirmó al nacer por características anatómicas externas según el atlas de Theiler.<sup>148</sup>

*Eutanasia.* Al cumplir la edad de interés, se sacrificó a la ratona gestante con pentobarbital en dosis letal. Se realizó laparotomía, exponiendo útero. Se extirpó el útero y se disecaron los embriones rápidamente. Se realizó un lavado en solución helada de PBS para retirar exceso de sangre y posteriormente se dejaron en fijación por inmersión en formaldehído a 4% durante 48 horas. Posterior a esto, se realizaron 5 lavados en 50 ml de PBS durante 5 minutos cada uno, y se colocaron en solución de sacarosa al 30%. Los ratones de E14.0 y E15.0 se fijaron completos, mientras que los E16.0 y E17.0 se decapitaron previo a la fijación. Se seccionaron en cortes coronales de 16  $\mu\text{m}$  de grosor.

## VIII. RESULTADOS

### **Objetivo 1. Determinar si las neuronas de orexina producen EBF2 en el ratón adulto**

#### *Estandarización*

Se estandarizó el ensayo para los anticuerpos anti-EBF2 de oveja, anti-orexina-A de conejo y anti-orexina-B de conejo. Como control positivo para EBF2, se analizó el epitelio olfatorio de ratón, y como control positivo para ambas orexinas, se analizaron cortes de hipotálamo lateral. Primero, se llevó a cabo la inmunofluorescencia en cortes bloqueados con albúmina de suero bovino. No se logró observar señal de EBF2 ni de OX-A. Se optó por modificar la técnica, esta vez bloqueando las uniones inespecíficas con suero normal de burro a 5%. Se realizó la técnica sin recuperación de antígeno y con recuperación de antígeno en dos protocolos distintos, el de solución de citrato de sodio pH 6.0 y el de solución de Tris pH 8.0. Se observó una buena señal sin realizar recuperación de antígeno.

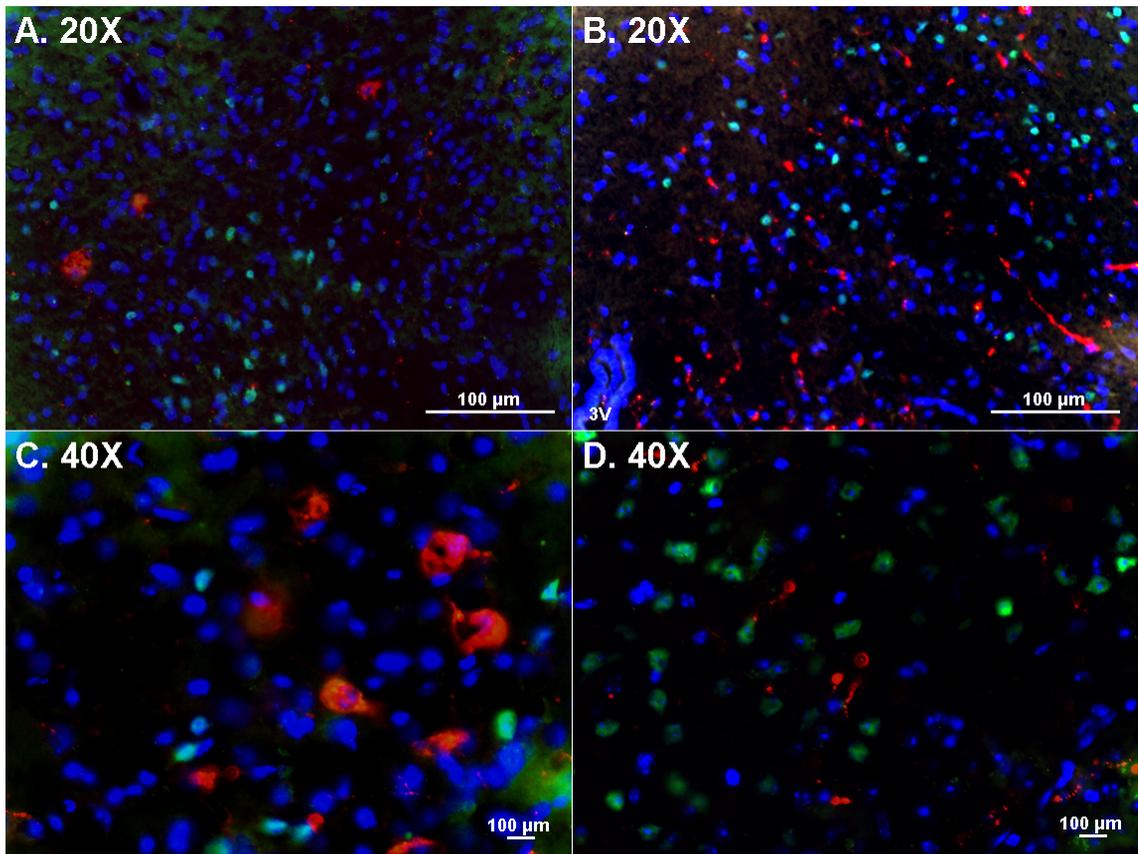
En epitelio olfatorio, se logró observar la presencia de células positivas para Ebf2 (verde) y células negativas para Ebf2 positivas para DAPI tanto en el tejido conectivo subyacente como en el área de epitelio respiratorio. En los cortes de hipotálamo lateral, se observa la presencia de cuerpos neuronales y axones positivos para Orexina-B y Orexina-A.

EBF2 se presenta en el compartimento nuclear, y ambas orexinas en el citoplasma del soma y en fibras axonales. Los patrones de expresión de orexina-B y de orexina-A son consistentes con lo que se ha reportado previamente<sup>149</sup>.

#### *Ensayo de doble marcaje*

El primer hallazgo de este ensayo fue que se detectó EBF2 en hipotálamo lateral (figura 11). También se detectaron neuronas de orexina (OX-B+) en la misma región, en ocasiones intercaladas con las EBF2+. Se contó una media de 318.25 ( $\pm 60.23$ ) células en los cortes analizados por ratón (uno de cada diez), con lo cual se estiman 3182.5

( $\pm 602.34$ ) células en total por cerebro. Sin embargo, no se encontró colocalización en ninguna de las células analizadas, en ninguno de los ratones estudiados.



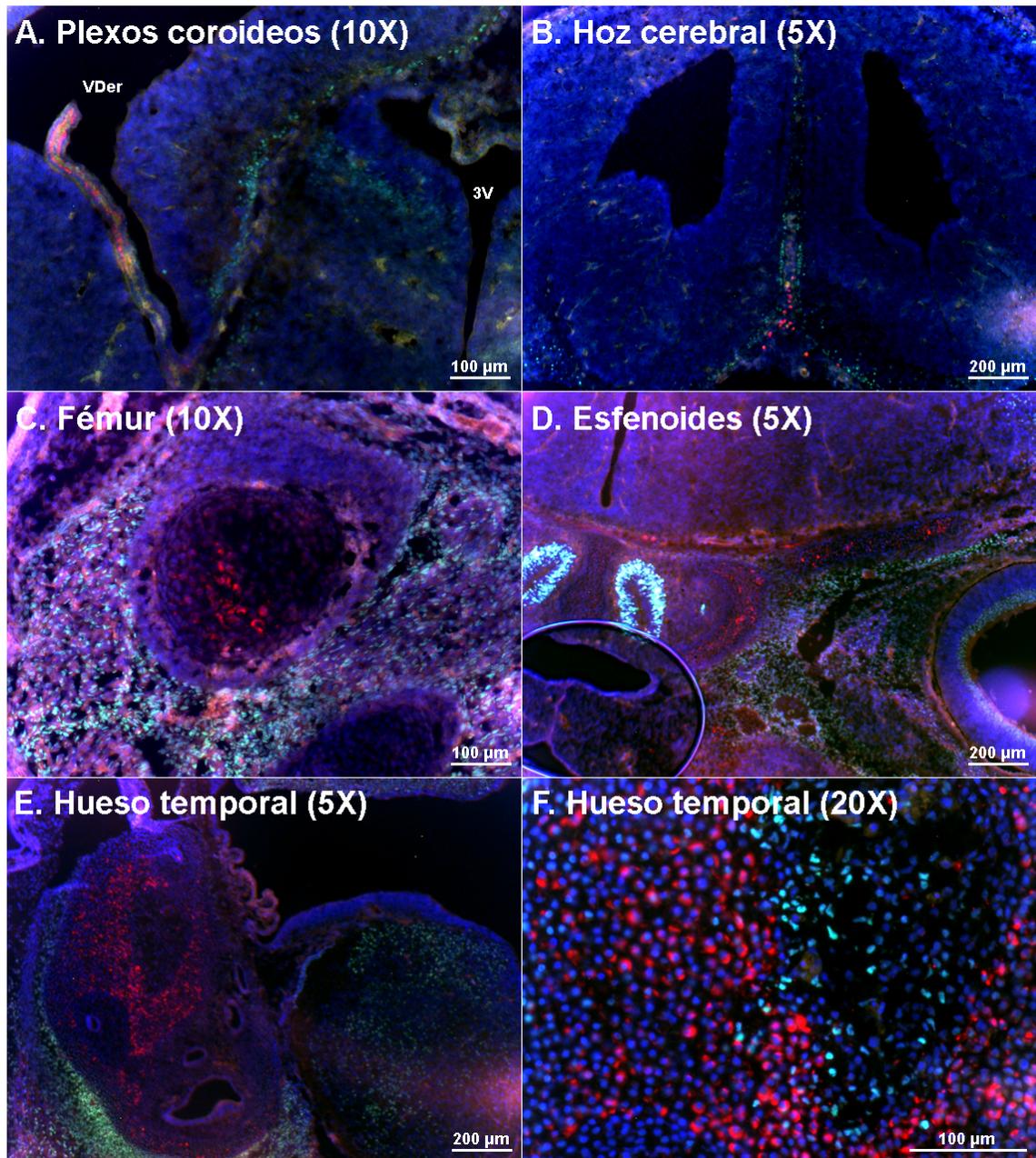
**Figura 11. Orexina-A y Ebf2 en el adulto**

En esta figura, se presentan imágenes compuestas de diferentes campos representativos en donde se evidencia la presencia de células orexina-B+ y células EBF2+. La señal de orexina-B se observa en el canal rojo, con una distribución citoplasmática; la señal de EBF2 se observa en el canal verde, con una distribución nuclear; y los núcleos, teñidos con DAPI, se observan en el canal azul. A, B y C. En el hipotálamo lateral, hay presencia de una población de células EBF2+, las cuales no colocalizan con los somas de orexina. D. En VTA, un sitio diana de las OXN, se observan células EBF2+ intercaladas con axones de orexina.

## **Objetivo 2. Determinar si hay presencia de EBF2 durante el desarrollo embrionario en las neuronas de orexina.**

Para determinar la región del hipotálamo en el cerebro de embriones, se utilizó el atlas de desarrollo embrionario de cortes coronales de Kaufman<sup>150</sup>, explorando el área rotulada como “hipotálamo” en cada etapa embrionaria analizada.

En este ensayo, se pudo detectar presencia de EBF2 en hipotálamo desde la etapa E14.0. Orexina-B se detectó en las tres etapas, en cartílagos primordiales, cola, hígado, intestino, plexos coroideos y hoz cerebral (figura 12). No se detecta orexina-B en hipotálamo en ninguna etapa. En algunos tejidos, se detectó señal de orexina-B cerca de EBF2, aunque no se detectó colocalización.

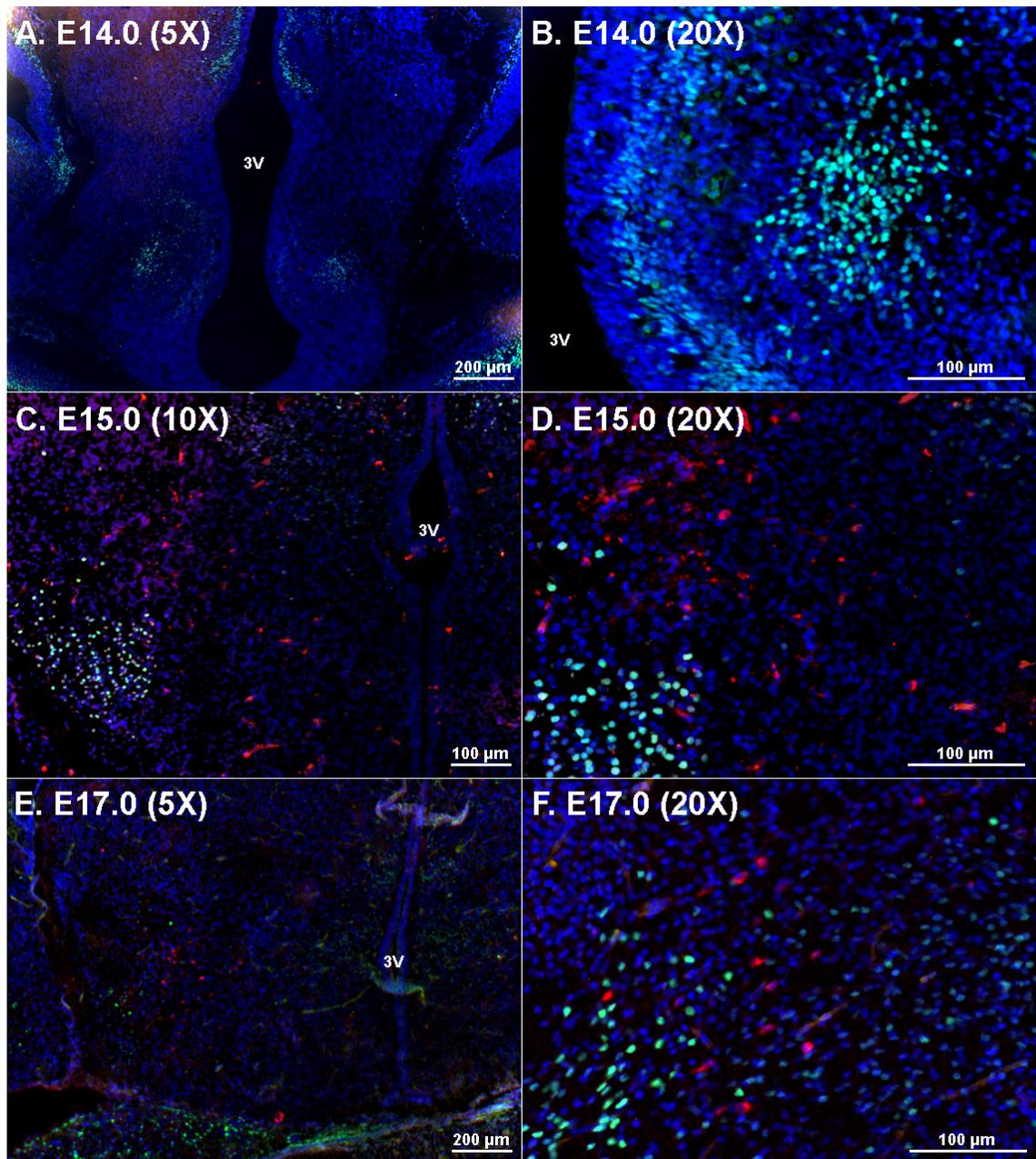


**Figura 12. Presencia de orexina-B fuera del sistema nervioso**

Orexina-B no se detectó dentro del hipotálamo o en el parénquima cerebral. Sin embargo, fue notoria su presencia en otros sitios, como en los plexos coroideos (A), en la hoz cerebral (B), y en cartílagos precursores de hueso, como el

fémur (C), esfenoides (D) y porción petrosa del temporal (E y F). En sistema óseo, se detectó que se solía encontrar señal de OXB en el centro y señal EBF2 en la periferia del cartílago. VDer – ventrículo derecho; 3V – tercer ventrículo.

Se optó por utilizar un anticuerpo dirigido contra Orexina-A para tratar de detectar señal a nivel de hipotálamo. Se detectaron células positivas a OX-A en el hipotálamo en las etapas E15.0 y E17.0 (figura 13). Sin embargo, estas células no colocalizan con EBF2. Tanto en hipotálamo como cartílago, se encontró señal de orexina-B en el centro y señal EBF2 en la periferia.



**Figura 13. Presencia de OXN en hipotálamo en el desarrollo embrionario**

En esta figura se presenta el hipotálamo en las tres etapas embrionarias analizadas. En E14.0 (A y B), se observa la presencia de células EBF2+ en el hipotálamo. Sin embargo, no se detectó señal de orexina-A. En las siguientes dos etapas, se detectaron somas de orexina en el hipotálamo, intercalados con células EBF2+, similar al adulto. No se presenta colocalización entre las señales. 3V – tercer ventrículo.

Se ha descrito que EBF2 se detecta en el hipotálamo desde la etapa E12.5<sup>126</sup>, y en este estudio se evidenció desde la primera etapa analizada (E14.0). Se detectaron neuronas de orexina a partir de E15.0, un día posterior a lo reportado<sup>9</sup>. Esto puede

deberse a que los otros autores utilizaron un anticuerpo de otra casa comercial formulado con un fragmento distinto de orexina-A, un protocolo de inmunofluorescencia distinto y fueron visualizados en un microscopio confocal.

### **Objetivo 3. Determinar si otras poblaciones neuronales del hipotálamo lateral producen EBF2.**

Se analizaron las siguientes poblaciones del hipotálamo lateral: MCH, CART, neurotensina, LepRb y neuropéptido-Y.

#### *MCH*

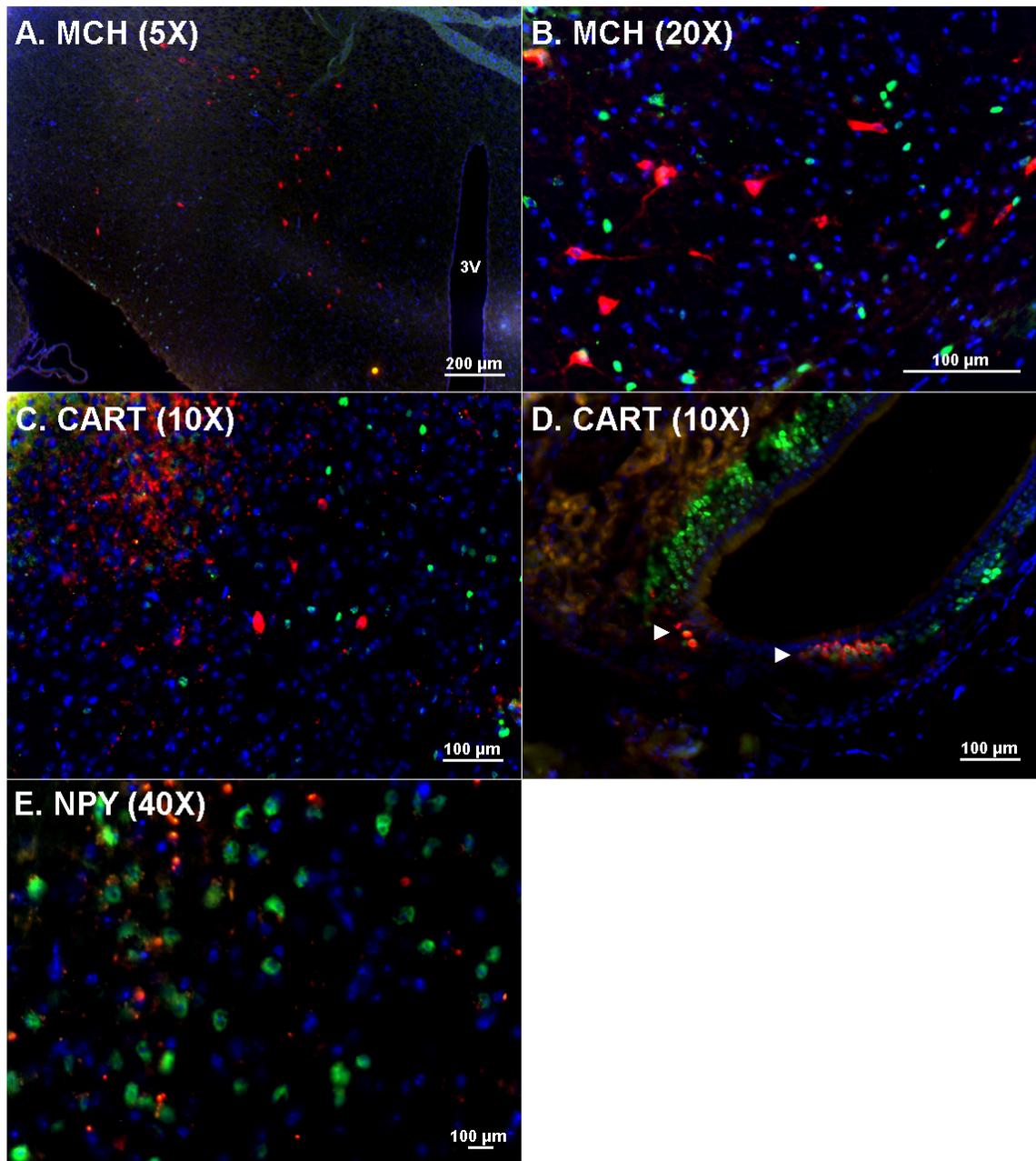
Se detectó señal de MCH en hipotálamo lateral (figura 14A-B). Aunque no colocaliza con la señal de EBF2, se encontró que ambas poblaciones neuronales se distribuyen en el mismo nivel y se intercalan unas con otras. Se detectó una media de 3535 ( $\pm 89.62$ ) células en los cerebros analizados, de las cuales ninguna expresa EBF2.

#### *CART*

Se detectó a la población CART+ en hipotálamo lateral, pero esta población tampoco colocaliza con EBF2 (figura 14C-D).

#### *Neuropéptido Y*

No se encontró señal de neuropéptido Y en hipotálamo lateral y, por lo tanto, no colocaliza con las células EBF2+ en LHA (figura 14E).



**Figura 14. Ausencia de EBF2 en células MCH, CART y NPY del LHA.**

Se detectaron las poblaciones MCH+ (A y B) y CART (C) en el hipotálamo lateral (rojo) y se detectaron células positivas a EBF2 (verde), y no hubo colocalización entre ambas. D. En epitelio olfatorio, se detectó señal de CART en neuronas olfatorias, y hubo colocalización con EBF2 (puntas de flecha). E. No se detectan somas de NPY en LHA. 3V – tercer ventrículo.

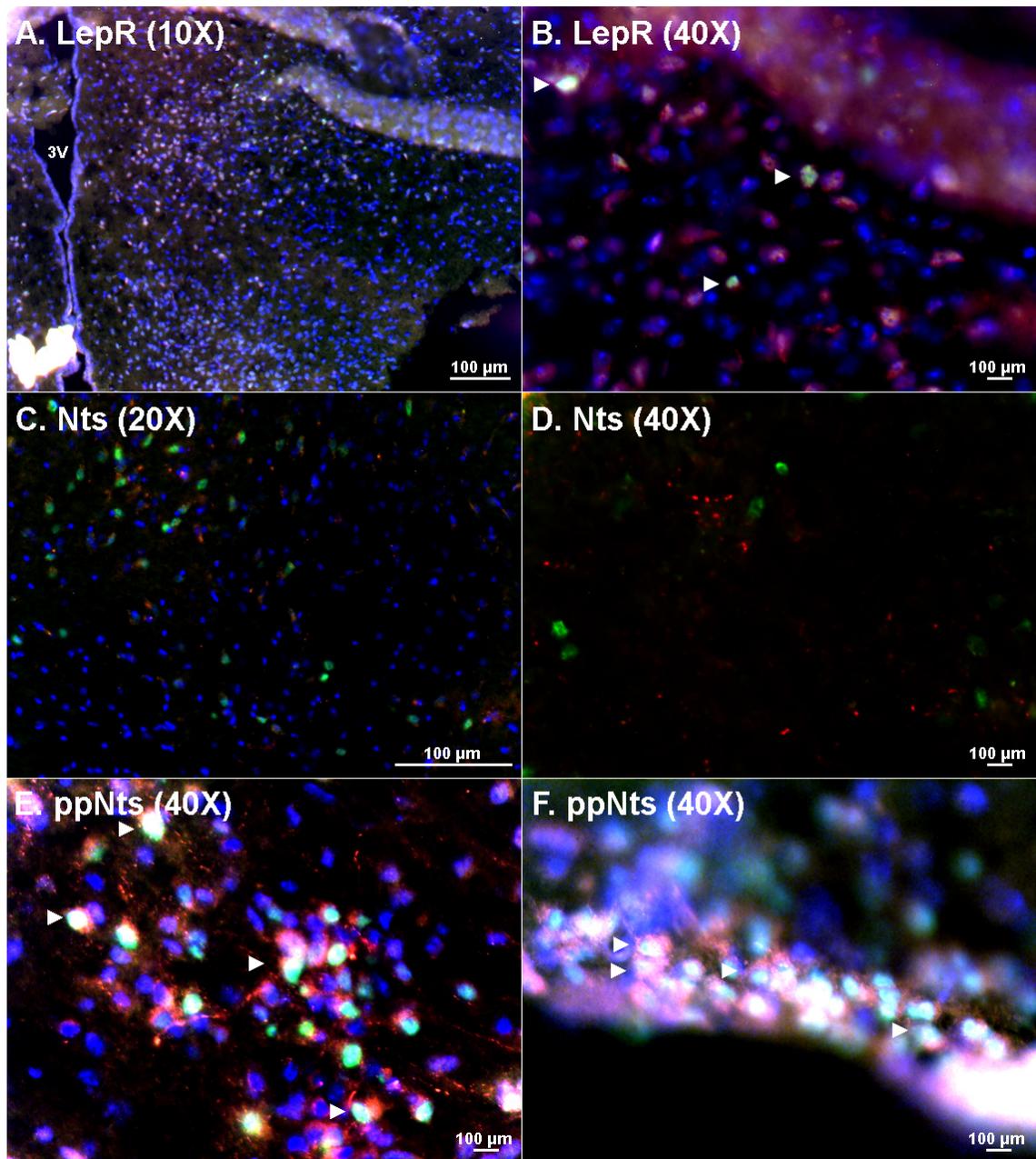
### *Receptor de leptina LepR*

Se realizó el ensayo de doble marcaje LepR con EBF2 (figura 15A-B). Sin embargo, ocurrió una reacción cruzada de los anticuerpos secundarios, uno dirigido

contra oveja y el otro contra cabra (por la naturaleza de los anticuerpos primarios), por lo que se detectó un patrón similar en los canales de ambos fluorocromos. Debido a la reacción cruzada, no se puede evaluar colocalización.

### *Neurotensina*

En el ensayo con anticuerpo dirigido contra neurotensina (figura 15C-D), se detectó señal en fibras axonales pero no se detectaron los somas en hipotálamo. Se repitió el ensayo, ahora con anticuerpos dirigidos contra prepro-neurotensina, el cual se espera que se localice en el cuerpo neuronal. Se encontraron abundantes células positivas a ppNts en hipotálamo lateral y núcleo arqueado, y una parte de esta población colocalizó con EBF2 (figura 15E-F).



**Figura 15. Resultado de ensayo de EBF2 con LepR, Nts y ppNts.**

A y B. En el ensayo de LepR, se detectó una señal similar en los canales rojo y verde, esto posiblemente debido a que los anticuerpos primarios provienen de especies relacionadas. Se logra observar una señal EBF2+ más intensa, pero no se puede concluir que hay colocalización debido a la señal cruzada. C y D. El ensayo con Nts resultó en una señal débil y los somas no se logran distinguir con claridad. E y F. ppNts presenta una señal débil del anticuerpo anti-ppNts. Sin embargo, se aprecia colocalización en las neuronas (punta de flecha).

## Discusión

### *EBF2 se expresa en el área lateral del hipotálamo por poblaciones celulares específicas*

Se conoce que EBF2 juega un papel importante en el desarrollo de diversos grupos neuronales<sup>129,131,133</sup>. En este estudio, se detectó que hay presencia de células positivas a EBF2 desde la etapa embrionaria más temprana contemplada (E14.0) y continúa presente hasta la etapa adulta, lo cual evidencia la importancia de EBF2 en el área lateral del hipotálamo. Es posible que EBF2 juegue un papel importante en el desarrollo de los circuitos del hipotálamo lateral. Esto explicaría por qué en ratones nulos para *Ebf2*<sup>8</sup> hay un efecto negativo drástico en la población de orexina.

### *Las neuronas orexinérgicas no expresan EBF2 en el adulto ni durante el desarrollo embrionario*

En el análisis de colocación de orexina con EBF2, no se detectó colocación en el hipotálamo adulto ni en el embrionario. Por ello, no es plausible que EBF2 regule la expresión de *HCRT* o algún otro gen necesario para la supervivencia o desarrollo de las neuronas de orexina, como se había visto en el estudio *in vitro*<sup>147</sup>. Entonces, el efecto visto en los *knockout* de *Ebf2* debe de ser indirecto a través de otras poblaciones celulares.

### *Las neuronas de neurotensina del hipotálamo lateral expresan EBF2*

Tanto orexina y neurotensina se expresan en LHA y regulan la ingesta, actividad motora y sistema de recompensa. Las neuronas de orexina expresan el receptor 2 de neurotensina (NTSR-2) y se inhiben por estímulo de la población de neurotensina.<sup>14</sup>

Por inmunofluorescencia, encontramos somas de neurotensina en el hipotálamo lateral, lo cual concuerda con lo que está reportado en la literatura<sup>151</sup>. Una fracción de esta población presentó señal de EBF2 en el compartimento nuclear, lo cual representa un dato novedoso. No existen publicaciones que analicen la relación entre EBF2 y

neurotensina u otro marcador de poblaciones del hipotálamo lateral contemplado en este estudio.

Otros autores han explorado la relación anatómica y funcional entre la población de orexina y la de neurotensina, en particular la subpoblación positiva para neurotensina y receptor de leptina, forma larga (Nts+/LepRb+). Estas poblaciones neuronales, en conjunto, integran señales humorales de apetito/saciedad y lo llevan hacia los sistemas de conducta motivada. Las neuronas de orexina son activadas por ghrelina a través de receptores GHS-R, y son sensibles a leptina por vía indirecta a través de las neuronas Nts+/LepRb+. Éstas últimas tienen un efecto inhibitorio en las neuronas de orexina.

Sin embargo, se ha visto en ratones con bloqueo de *NTS* no produce un fenotipo similar al de *EBF2*-null. Los ratones con delección de *NTS* son similares a los silvestres en apariencia general, anatomía, peso corporal, reproducción y comportamiento aparente,<sup>152</sup> mientras que los ratones sin *EBF2* presentan disminución en actividad locomotora, ingesta, alteración del ciclo sueño/vigilia, menor tamaño y menor peso corporal<sup>8</sup>. Los ratones con delección del receptor de leptina en neuronas Nts+/LepRb+ presentan una alteración en la respuesta a leptina y a ghrelina por las neuronas de orexina<sup>153</sup>. En este modelo tampoco se observa una disminución de la población de neuronas de orexina, aunque pudiera deberse a que no se eliminaron experimentalmente las neuronas Nts+/LepRb+, sino que se bloqueó la producción de LepRb en dichas neuronas<sup>153,154</sup>.

Se han explorado aspectos sobre el papel de neuronas Nts sobre las neuronas de orexina pero no se ha analizado la relación de ambas poblaciones durante el desarrollo del hipotálamo en la etapa embrionaria. Es necesario analizar el efecto de la delección de *EBF2* en las neuronas de Nts, o realizar un modelo de ablación de neuronas Nts y analizar las repercusiones en las neuronas de orexina para conocer la relación de estas poblaciones durante el desarrollo.

*EBF2 se expresa en algunas neuronas olfatorias CART-érgicas*

Como hallazgo, se detectó EBF2 en neuronas olfatorias CART+. Aunque se ha descrito la presencia de EBF2<sup>155</sup> y de CART<sup>156</sup> en epitelio olfatorio, no se ha reportado su colocalización y no existen publicaciones en las que se explore la interacción entre *Ebf2* y *Cartpt*. Esto representa una aportación de este trabajo, la cual se deberá de explorar a fondo en proyectos futuros.

#### *EBF2 y orexina se encuentran en algunos tejidos pero en distintas poblaciones celulares*

Se encontró una relación anatómica espacial entre células positivas a EBF2 y a orexinas en el cerebro y en algunos tejidos fuera del SNC. Las células EBF2 se suelen acompañar de axones de orexina en hipotálamo lateral, tálamo, núcleos septales y tallo cerebral. Durante las etapas embrionarias analizadas, también se detectó señal de orexinas en el centro de los cartílagos primordiales (esfenoides, cartílago de Meckel, temporal, fémur, entre otros), y se detectaba señal EBF2 en la periferia de los cartílagos.

Se conoce que las orexinas favorecen la formación ósea y su ausencia resulta en una reducción de masa ósea<sup>157</sup>. En el mismo estudio, determinaron que se expresaban orexinas y OX1R en tibia, y dicha expresión de orexina se daba en células madre mesenquimales, osteoblastos y adipocitos de médula ósea. En otro estudio en ratones con obstrucción de la vía aérea, el incremento de expresión de orexinas y receptor OX1R juegan un papel en las anomalías en el sueño y en el crecimiento asociadas a la obstrucción<sup>158</sup>.

Por otro lado, se ha detectado señal de EBF2 en tejido conectivo que rodea condensaciones condrogénicas y formando tendones durante la etapa embrionaria en modelos animal<sup>140</sup>, lo cual es similar a lo observado en este estudio. También se ha reportado que EBF2 se expresa en progenitores de osteoblastos como regulador de diferenciación de osteoclastos, y la falta de *Ebf2* resulta en una disminución de la masa ósea<sup>141</sup>.

#### *Papel de EBF2 en el desarrollo de las neuronas orexinérgicas*

Se ha descrito que los miembros de la familia EBF juegan un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados. Durante la neurogénesis, los genes de la familia EBF son necesarios en progenitores neuroepiteliales para iniciar diferenciación neuronal, migración hacia la capa del manto y salida del ciclo celular<sup>159</sup>. Existen publicaciones en las cuales se ha explorado el papel que juega EBF2 en distintas poblaciones neuronales específicas. Dentro de las funciones en el desarrollo del sistema nervioso, se sabe que regula la diferenciación, migración, supervivencia, proyección y establecimiento de patrones.

Chuang describió que *Ebf2* es necesario para la neurogénesis cortical a través de la diferenciación de células Cajal-Rezius<sup>132</sup>. Croci y colaboradores reportaron que EBF2 regula la migración y la supervivencia de las células de Purkinje durante el desarrollo embrionario y postnatal, el establecimiento de patrones de la vermis cerebelar y la determinación de un fenotipo específico de neuronas cerebelares<sup>133</sup>; Bizzoca después demostró que algunos de estos efectos se deben a la regulación en la expresión de contactina-1 dependiente de EBF2<sup>136</sup>. Wang y colaboradores demostraron que la ausencia de *Ebf2* resulta en una falla en la proyección de las neuronas receptoras olfatorias hacia el bulbo olfatorio<sup>138</sup>.

Todos estos ejemplos explican diferentes procesos en los cuales la ausencia de EBF2 resulta en falla del desarrollo de la población estudiada. En las neuronas de orexina también se observa un efecto que aún queda por esclarecer.

## Conclusión

Las neuronas de orexinas requieren de la función de EBF2 para tener un adecuado desarrollo o supervivencia. Dicha función no se da por regulación directa del gen de orexina (*HCRT*) o de algún otro gen dentro de las neuronas de orexina. La relación de EBF2 con las neuronas de orexina es indirecta, ya que se observa una relación espacial entre las neuronas de orexina y las neuronas EBF2 en hipotálamo como fuera del hipotálamo y en distintas etapas del desarrollo. Además, se demostró que EBF2 se encuentra desde fases tempranas en la vecindad de las poblaciones que forman posteriormente al hipotálamo lateral, y una población de EBF2 persiste hasta la etapa adulta en el mismo sitio. Se explorará más a fondo esta relación en futuros proyectos en el grupo de investigación para elucidar el mecanismo homeostático que ejerce el gen *Ebf2* en las neuronas de orexina y en otras neuronas del hipotálamo lateral.

## REFERENCIAS

1. Xie Y, Dorsky RI. Development of the hypothalamus: conservation, modification and innovation. *Development*. 2017;144(9):1588 LP-1599. doi:10.1242/dev.139055.
2. Bonnavion P, Mickelsen LE, Fujita A, de Lecea L, Jackson AC. Hubs and spokes of the lateral hypothalamus: cell types, circuits and behaviour. *J Physiol*. 2016;594(22):6443-6462. doi:10.1113/JP271946.
3. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, et al. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(1):322-327. doi:10.1073/pnas.95.1.322.
4. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 1998;92(4):573-585. doi:10.1016/S0092-8674(00)80949-6.
5. Bittencourt J, Presse F, Arias C, et al. The melanin concentrating hormone system of the rat brain An immuno and hybridisation histochemical characterisation.pdf. *J Comp Neurol*. 1992;319:218-245. doi:10.1002/cne.903190204.
6. Scammell TE, Arrigoni E, Lipton JO. Review Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron*. 2017;93(4):747-765. doi:10.1016/j.neuron.2017.01.014.
7. Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, et al. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*. 2000;27(3):469-474. doi:10.1016/S0896-6273(00)00058-1.
8. De La Herrán AK, Zomosa VC, Millán DA, et al. Aspects of the narcolepsy-cataplexy syndrome in O/E3-null mutant mice. *Neuroscience*. 2011;183:134-143. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.03.029.
9. Ogawa Y, Kanda T, Vogt K, Yanagisawa M. Anatomical and electrophysiological development of the hypothalamic orexin neurons from embryos to neonates. *J Comp Neurol*. 2017. doi:10.1002/cne.24261.
10. Sakurai T, Mieda M. Connectomics of orexin-producing neurons: Interface of systems of emotion, energy homeostasis and arousal. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(8):451-462. doi:10.1016/j.tips.2011.03.007.
11. Sakurai T, Moriguchi T, Furuya K, et al. Structure and Function of Human Prepro-orexin Gene \*. 1999;274(25):17771-17776.
12. Abrahamson EE, Leak RK, Moore RY. The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport*. 2001;12(2):435-440. doi:10.1097/00001756-200102120-00048.

13. Chou TC, Lee CE, Lu J, et al. Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin. *J Neurosci*. 2001;21(19):RC168. doi:20015644 [pii].
14. Furutani N, Hondo M, Kageyama H, et al. Neurotensin Co-Expressed in Orexin-Producing Neurons in the Lateral Hypothalamus Plays an Important Role in Regulation of Sleep/Wakefulness States. *PLoS One*. 2013;8(4). doi:10.1371/journal.pone.0062391.
15. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, et al. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*. 2001;30(2):345-354. doi:10.1016/s0896-6273(01)00293-8.
16. Magga J, Bart G, Oker-Blom C, Kukkonen JP, Akerman KEO, Näsman J. Agonist potency differentiates G protein activation and Ca<sup>2+</sup> signalling by the orexin receptor type 1. *Biochem Pharmacol*. 2006;71(6):827-836. doi:10.1016/j.bcp.2005.12.021.
17. Holmqvist T, Johansson L, Östman M, Ammoun S, Åkerman KEO, Kukkonen JP. OX 1 Orexin Receptors Couple to Adenylyl Cyclase Regulation via Multiple Mechanisms. *J Biol Chem*. 2005;280(8):6570-6579. doi:10.1074/jbc.M407397200.
18. Tang J, Chen J, Ramanjaneya M, Punn A, Conner AC, Randeve HS. The signalling profile of recombinant human orexin-2 receptor. *Cell Signal*. 2008;20(9):1651-1661. doi:10.1016/j.cellsig.2008.05.010.
19. Ammoun S, Johansson L, Ekholm ME, et al. OX1 orexin receptors activate extracellular signal-regulated kinase in Chinese hamster ovary cells via multiple mechanisms: the role of Ca<sup>2+</sup> influx in OX1 receptor signaling. *Mol Endocrinol*. 2006;20(1):80-99. doi:10.1210/me.2004-0389.
20. Shin HS, Cho HS, Sung K-W, Yoon B-J. Orexin-A increases cell surface expression of AMPA receptors in the striatum. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378(3):409-413. doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.051.
21. Selbach O, Bohla C, Barbara A, et al. Orexins/hypocretins control bistability of hippocampal long-term synaptic plasticity through co-activation of multiple kinases. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010;198(3):277-285. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.02021.x.
22. Spinazzi R, Ziolkowska A, Neri G, et al. Orexins modulate the growth of cultured rat adrenocortical cells, acting through type 1 and type 2 receptors coupled to the MAPK p42/p44- and p38-dependent cascades. *Int J Mol Med*. May 2005. doi:10.3892/ijmm.15.5.847.
23. Peltonen HM, Magga JM, Bart G, et al. Involvement of TRPC3 channels in calcium oscillations mediated by OX(1) orexin receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;385(3):408-412. doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.077.
24. Johansson L, Ekholm ME, Kukkonen JP. Multiple phospholipase activation by

- OX(1) orexin/hypocretin receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(12):1948-1956. doi:10.1007/s00018-008-8206-z.
25. Rouet-Benzineb P, Rouyer-Fessard C, Jarry A, et al. Orexins acting at native OX(1) receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX(1) receptor suppress cell growth by inducing apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279(44):45875-45886. doi:10.1074/jbc.M404136200.
  26. Shih C-D, Chuang Y-C. Nitric oxide and GABA mediate bi-directional cardiovascular effects of orexin in the nucleus tractus solitarii of rats. *Neuroscience.* 2007;149(3):625-635. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.07.016.
  27. Skrzypski M, T Le T, Kaczmarek P, et al. Orexin A stimulates glucose uptake, lipid accumulation and adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes and isolated primary rat adipocytes. *Diabetologia.* 2011;54(7):1841-1852. doi:10.1007/s00125-011-2152-2.
  28. Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, et al. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J Pharmacol Sci.* 2003;92(3):259-266. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12890892>.
  29. Yang B, Samson WK, Ferguson A V. Excitatory effects of orexin-A on nucleus tractus solitarius neurons are mediated by phospholipase C and protein kinase C. *J Neurosci.* 2003;23(15):6215-6222. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12867505>.
  30. Muroya S, Funahashi H, Yamanaka A, et al. Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca<sup>2+</sup> signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur J Neurosci.* 2004;19(6):1524-1534. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03255.x.
  31. van den Top M, Nolan MF, Lee K, et al. Orexins induce increased excitability and synchronisation of rat sympathetic preganglionic neurones. *J Physiol.* 2003;549(Pt 3):809-821. doi:10.1113/jphysiol.2002.033290.
  32. Randeve HS, Karteris E, Grammatopoulos D, Hillhouse EW. Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(10):4808-4813. doi:10.1210/jcem.86.10.7921.
  33. Chen Q, de Lecea L, Hu Z, Gao D. The Hypocretin/Orexin System: An Increasingly Important Role in Neuropsychiatry. *Med Res Rev.* 2015;35(1):152-197. doi:10.1002/med.21326.
  34. Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res.* 1999;827(1-2):243-260. doi:10.1016/S0006-8993(99)01336-0.

35. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*. 1998;18(23):9996-10015. doi:10.1111/j.1524-6271.1998.18239996.x
36. Yamamoto Y, Ueta Y, Hara Y, et al. Postnatal development of orexin/hypocretin in rats. *Mol Brain Res*. 2000;78(1-2):108-119. doi:10.1016/S0169-328X(00)00080-2
37. Steininger TL, Kilduff TS, Behan M, Benca RM, Landry CF. Comparison of hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone neurons and axonal projections in the embryonic and postnatal rat brain. *J Chem Neuroanat*. 2004;27(3):165-181. doi:10.1016/j.jchemneu.2004.02.007
38. Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A, et al. Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron*. 2005;46(2):297-308. doi:10.1016/j.neuron.2005.03.010
39. Yoshida K, McCormack S, España RA, Crocker A, Scammell TE. Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *J Comp Neurol*. 2006;494(5):845-861. doi:10.1002/cne.20859
40. Kayaba Y, Nakamura A, Kasuya Y, et al. Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(3):R581-R593. doi:10.1152/ajpregu.00671.2002
41. Zhang W, Sakurai T, Fukuda Y, Kuwaki T. Orexin neuron-mediated skeletal muscle vasodilation and shift of baroreflex during defense response in mice. 2006:1-8. doi:10.1152/ajpregu.00704.2005
42. Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB. Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci*. 1998;18(12):4705-4721. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9614245>.
43. Lu J, Bjorkum AA, Xu M, Gaus SE, Shiromani PJ, Saper CB. Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep. *J Neurosci*. 2002;22(11):4568-4576. doi:20026455
44. Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(3):171-181. doi:10.1038/nrn2092
45. Li Y, Gao XB, Sakurai T, van den Pol AN. Hypocretin/Orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system. *Neuron*. 2002;36(6):1169-1181. doi:12495630
46. Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T. Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303(1):120-129. doi:12646175
47. Yamanaka A, Muraki Y, Ichiki K, et al. Orexin neurons are directly and indirectly

- regulated by catecholamines in a complex manner. *J Neurophysiol.* 2006;96(1):284-298. doi:10.1152/jn.01361.2005.
48. Furutani N, Hondo M, Tsujino N, Sakurai T. Activation of bombesin receptor subtype-3 influences activity of orexin neurons by both direct and indirect pathways. *J Mol Neurosci.* 2010;42(1):106-111. doi:10.1007/s12031-010-9382-5.
  49. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, et al. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron.* 2003;38(5):701-713. doi:10.1016/S0896-6273(03)00331-3.
  50. Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhatsky A. Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J Neurosci.* 2005;25(9):2429-2433. doi:10.1523/JNEUROSCI.4925-04.2005.
  51. López M, Señaris R, Gallego R, et al. Orexin Receptors Are Expressed in the Adrenal Medulla of the Rat. *Endocrinology.* 1999;140(12):5991-5994. doi:10.1210/endo.140.12.7287.
  52. Jöhren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P. Prepro-Orexin and Orexin Receptor mRNAs Are Differentially Expressed in Peripheral Tissues of Male and Female Rats. [Http://DxDoiOrg/101210/Endo14288299](http://DxDoiOrg/101210/Endo14288299). 2011;142(October):3324-3331. doi:10.1210/en.142.8.3324.
  53. Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, et al. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci.* 2001;14(7):1075-1081. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11683899>.
  54. Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM. Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron.* 2005;46(5):787-798. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.035.
  55. Estabrooke I V, McCarthy MT, Ko E, et al. Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci.* 2001;21(5):1656-1662. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222656>.
  56. Eggermann E, Serafin M, Bayer L, et al. Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones. *Neuroscience.* 2001;108(2):177-181. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734353>.
  57. Alam MN, Szymusiak R, Gong H, King J, McGinty D. Adenosinergic modulation of rat basal forebrain neurons during sleep and waking: neuronal recording with microdialysis. *J Physiol.* 1999;521 Pt 3:679-690. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601498>.
  58. Takakusaki K, Takahashi K, Saitoh K, et al. Orexinergic projections to the cat midbrain mediate alternation of emotional behavioural states from locomotion to cataplexy. *J Physiol.* 2005;568(Pt 3):1003-1020.

doi:10.1113/jphysiol.2005.085829.

59. Pace-Schott EF, Hobson JA. The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(8):591-605. doi:10.1038/nrn895.
60. Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, et al. Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron*. 2003;38(5):715-730. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12797957>.
61. Morairty S, Rainnie D, McCarley R, Greene R. Disinhibition of ventrolateral preoptic area sleep-active neurons by adenosine: a new mechanism for sleep promotion. *Neuroscience*. 2004;123(2):451-457. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698752>.
62. Huang Z-L, Qu W-M, Eguchi N, et al. Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci*. 2005;8(7):858-859. doi:10.1038/nn1491.
63. Sakurai T. Roles of orexins and orexin receptors in central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2006;5(3):313-325. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16787231>.
64. Haynes AC, Chapman H, Taylor C, et al. Anorectic, thermogenic and anti-obesity activity of a selective orexin-1 receptor antagonist in ob/ob mice. *Regul Pept*. 2002;104(1-3):153-159. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11830290>.
65. Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol*. 1999;160(3):R7-12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10077743>.
66. Haynes AC, Jackson B, Chapman H, et al. A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul Pept*. 2000;96(1-2):45-51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102651>.
67. Yamada H, Okumura T, Motomura W, Kobayashi Y, Kohgo Y. Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;267(2):527-531. doi:10.1006/bbrc.1999.1998.
68. Hara J, Yanagisawa M, Sakurai T. Difference in obesity phenotype between orexin-knockout mice and orexin neuron-deficient mice with same genetic background and environmental conditions. *Neurosci Lett*. 2005;380(3):239-242. doi:10.1016/j.neulet.2005.01.046.
69. Schuld A, Hebebrand J, Geller F, Pollmächer T. Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet (London, England)*. 2000;355(9211):1274-1275. doi:10.1016/S0140-6736(05)74704-8.

70. Lammers GJ, Pijl H, Iestra J, Langius JA, Buunk G, Meinders AE. Spontaneous food choice in narcolepsy. *Sleep*. 1996;19(1):75-76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8650468>.
71. Silva JP, von Meyenn F, Howell J, Thorens B, Wolfrum C, Stoffel M. Regulation of adaptive behaviour during fasting by hypothalamic Foxa2. *Nature*. 2009;462(7273):646-650. doi:10.1038/nature08589.
72. Yamanaka A, Kunii K, Nambu T, et al. Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res*. 2000;859(2):404-409. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10719096>.
73. Thorpe AJ, Kotz CM. Orexin A in the nucleus accumbens stimulates feeding and locomotor activity. *Brain Res*. 2005;1050(1-2):156-162. doi:10.1016/j.brainres.2005.05.045.
74. Baldo BA, Gual-Bonilla L, Sijapati K, Daniel RA, Landry CF, Kelley AE. Activation of a subpopulation of orexin/hypocretin-containing hypothalamic neurons by GABAA receptor-mediated inhibition of the nucleus accumbens shell, but not by exposure to a novel environment. *Eur J Neurosci*. 2004;19(2):376-386. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14725632>.
75. Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature*. 2005;437(7058):556-559. doi:10.1038/nature04071.
76. Boutrel B, Kenny PJ, Specio SE, et al. Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(52):19168-19173. doi:10.1073/pnas.0507480102.
77. Nair SG, Golden SA, Shaham Y. Differential effects of the hypocretin 1 receptor antagonist SB 334867 on high-fat food self-administration and reinstatement of food seeking in rats. *Br J Pharmacol*. 2008;154(2):406-416. doi:10.1038/bjp.2008.3.
78. Lawrence AJ, Cowen MS, Yang H-J, Chen F, Oldfield B. The orexin system regulates alcohol-seeking in rats. *Br J Pharmacol*. 2009;148(6):752-759. doi:10.1038/sj.bjp.0706789.
79. Hollander JA, Lu Q, Cameron MD, Kamenecka TM, Kenny PJ. Insular hypocretin transmission regulates nicotine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(49):19480-19485. doi:10.1073/pnas.0808023105.
80. Borgland SL, Taha SA, Sarti F, Fields HL, Bonci A. Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron*. 2006;49(4):589-601. doi:10.1016/j.neuron.2006.01.016.
81. Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, et al. Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J Neurosci*. 2006;26(2):398-405.

doi:10.1523/JNEUROSCI.2761-05.2006.

82. Guilleminault C, Carskadon M, Dement WC. On the Treatment of Rapid Eye Movement Narcolepsy. *Arch Neurol.* 1974;30(1):90-93. doi:10.1001/archneur.1974.00490310092014.
83. Di Sebastiano AR, Wilson-Pérez HE, Lehman MN, Coolen LM. Lesions of orexin neurons block conditioned place preference for sexual behavior in male rats. *Horm Behav.* 2011;59(1):1-8. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.09.006.
84. Gulia KK, Mallick HN, Kumar VM. Orexin A (Hypocretin-1) application at the medial preoptic area potentiates male sexual behavior in rats. *Neuroscience.* 2003;116(4):921-923. doi:10.1016/S0306-4522(02)00877-1.
85. Ida T, Nakahara K, Murakami T, Hanada R, Nakazato M, Murakami N. Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;270(1):318-323. doi:10.1006/bbrc.2000.2412.
86. Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, et al. Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci.* 2004;24(50):11439-11448. doi:10.1523/JNEUROSCI.3459-04.2004.
87. Furlong TM, Vianna DML, Liu L, Carrive P. Hypocretin/orexin contributes to the expression of some but not all forms of stress and arousal. *Eur J Neurosci.* 2009;30(8):1603-1614. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06952.x.
88. Sarchielli P, Rainero I, Coppola F, et al. Involvement of corticotrophin-releasing factor and orexin-A in chronic migraine and medication-overuse headache: Findings from cerebrospinal fluid. *Cephalalgia.* 2008;28(7):714-722. doi:10.1111/j.1468-2982.2008.01566.x.
89. Grafe LA, Cornfeld A, Luz S, Valentino R, Bhatnagar S. Orexins mediate sex differences in the stress response and in cognitive flexibility. *Biol Psychiatry.* 2017;81(8):683-692. doi:10.1016/j.biopsych.2016.10.013.
90. Al-Barazanji KA, Wilson S, Baker J, Jessop DS, Harbuz MS. Central orexin-A activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin neurones in conscious rats. *J Neuroendocrinol.* 2001;13(5):421-424. doi:10.1046/j.1365-2826.2001.00655.x.
91. Shirasaka T, Nakazato M, Matsukura S, Takasaki M, Kannan H. Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am J Physiol.* 1999;277(6 Pt 2):R1780-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600926>.
92. Shiuchi T, Haque MS, Okamoto S, et al. Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. *Cell Metab.* 2009;10(6):466-480. doi:10.1016/j.cmet.2009.09.013.
93. Inutsuka A, Yamashita A, Chowdhury S, et al. The integrative role of

- orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation. *Sci Rep*. 2016;6(July):29480. doi:10.1038/srep29480.
94. Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Chiba T. Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. *Br J Pharmacol*. 2002;137(2):170-176. doi:10.1038/sj.bjp.0704851.
  95. Bingham S, Davey PT, Babbs AJ, et al. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain*. 2001;92(1-2):81-90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11323129>.
  96. Longstreth WT, Koepsell TD, Ton TG, Hendrickson AF, van Belle G. The epidemiology of narcolepsy. *Sleep*. 2007;30(1):13-26. doi:10.1093/sleep/30.1.13.
  97. 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*. 1999;98(3):365-376. doi:10.1016/S0092-8674(00)81965-0.
  98. Ponz A, Khatami R, Poryazova R, et al. Reduced amygdala activity during aversive conditioning in human narcolepsy. *Ann Neurol*. 2010;67(3):394-398. doi:10.1002/ana.21881.
  99. Shiromani PJ, Armstrong DM, Berkowitz A, Jeste D V, Gillin JC. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactive somata in the feline brainstem: implications for REM sleep generation. *Sleep*. 1988;11(1):1-16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2896380>.
  100. Suzuki M, Beuckmann CT, Shikata K, Ogura H, Sawai T. Orexin-A (hypocretin-1) is possibly involved in generation of anxiety-like behavior. *Brain Res*. 2005;1044(1):116-121. doi:10.1016/j.brainres.2005.03.002.
  101. Strawn JR, Pyne-Geithman GJ, Ekhtor NN, et al. Low cerebrospinal fluid and plasma orexin-A (hypocretin-1) concentrations in combat-related posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2010;35(7):1001-1007. doi:10.1016/j.psyneuen.2010.01.001.
  102. Nowell PD, Buysse DJ. Treatment of insomnia in patients with mood disorders. *Depress Anxiety*. 2001;14(1):7-18. doi:10.1002/da.1042.
  103. Daniels E, King M a, Smith IE, Shneerson JM. Health-related quality of life in narcolepsy. *J Sleep Res*. 2001;10(1):75-81. doi:10.1046/j.1365-2869.2001.00234.x.
  104. Brundin L, Björkqvist M, Petersén Å, Träskman-Bendz L. Reduced orexin levels in the cerebrospinal fluid of suicidal patients with major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2007;17(9):573-579. doi:10.1016/j.euroneuro.2007.01.005.
  105. Salomon RM, Ripley B, Kennedy JS, et al. Diurnal variation of cerebrospinal fluid hypocretin-1 (Orexin-A) levels in control and depressed subjects. *Biol*

- Psychiatry*. 2003;54(2):96-104. doi:10.1016/S0006-3223(03)01740-7.
106. Janas-Kozik M, Stachowicz M, Krupka-Matuszczyk I, et al. Plasma levels of leptin and orexin A in the restrictive type of anorexia nervosa. *Regul Pept*. 2011;168(1-3):5-9. doi:10.1016/j.regpep.2011.02.005.
  107. Kastin AJ, Akerstrom V. Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;289(1):219-223. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10087007> <http://jpet.aspetjournals.org/content/289/1/219.full.pdf>.
  108. Nagahara T, Saitoh T, Kutsumura N, et al. Design and Synthesis of Non-Peptide, Selective Orexin Receptor 2 Agonists. *J Med Chem*. 2015;58(20):7931-7937. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00988.
  109. Irukayama-Tomobe Y, Ogawa Y, Tominaga H, et al. Nonpeptide orexin type-2 receptor agonist ameliorates narcolepsy-cataplexy symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(22):5731-5736. doi:10.1073/pnas.1700499114.
  110. Porter RA, Chan WN, Coulton S, et al. 1, 3-Biarylyureas as selective non-peptide antagonists of the orexin-1 receptor. *Bioorganic Med*. 2001;11:1907-1910. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X01003432>.
  111. Malherbe P, Borroni E, Pinard E, Wettstein JG. Biochemical and Electrophysiological Characterization of Almorexant , a Dual Orexin 1 Receptor ( OX 1 )/ Orexin 2 Receptor ( OX 2 ) Antagonist : Comparison with Selective OX 1 and OX 2 Antagonists. *Mol Pharmacol*. 2009;76(3):618-631. doi:10.1124/mol.109.055152.Orexins.
  112. Cox CD, Breslin MJ, Whitman DB, et al. Discovery of the dual orexin receptor antagonist [(7 R)-4-(5-chloro-1,3- benzoxazol-2-yl)-7-methyl-1,4-diazepan-1-yl][5-methyl-2-(2 H -1,2,3-triazol-2-yl)phenyl]methanone (MK-4305) for the treatment of insomnia. *J Med Chem*. 2010;53(14):5320-5332. doi:10.1021/jm100541c.
  113. Connor KM, Mahoney E, Jackson S, et al. A phase II dose-ranging study evaluating the efficacy and safety of the orexin receptor antagonist filorexant (MK-6096) in patients with primary insomnia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016;19(8):1-10. doi:10.1093/ijnp/pyw022.
  114. Mieda M, Willie JT, Hara J, Sinton CM, Sakurai T, Yanagisawa M. Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(13):4649-4654. doi:10.1073/pnas.0400590101.
  115. Liu M, Blanco-Centurion C, Konadhode R, et al. Orexin Gene Transfer into Zona Incerta Neurons Suppresses Muscle Paralysis in Narcoleptic Mice. *J Neurosci*. 2011;31(16):6028-6040. doi:10.1523/JNEUROSCI.6069-10.2011.
  116. Liu M, Blanco-Centurion C, Konadhode RR, Luan L, Shiromani PJ. Orexin gene

transfer into the amygdala suppresses both spontaneous and emotion-induced cataplexy in orexin-knockout mice. *Eur J Neurosci.* 2016;43(5):681-688. doi:10.1111/ejn.13158.

117. Kantor S, Mochizuki T, Lops SN, et al. Orexin gene therapy restores the timing and maintenance of wakefulness in narcoleptic mice. *Sleep.* 2013;36(8):1129-1138. doi:10.5665/sleep.2870.
118. Blanco-Centurion C, Liu M, Konadhode R, Pelluru D, Shiromani PJ. Effects of orexin gene transfer in the dorsolateral pons in orexin knockout mice. *Sleep.* 2013;36(1):31-40. doi:10.5665/sleep.2296.
119. Arias-Carrión O, Murillo-Rodríguez E. Effects of hypocretin/orexin cell transplantation on narcoleptic-like sleep behavior in rats. *PLoS One.* 2014;9(4):23-25. doi:10.1371/journal.pone.0095342.
120. Alvarez-Bolado G, Paul FA, Blaess S. Sonic hedgehog lineage in the mouse hypothalamus: from progenitor domains to hypothalamic regions. *Neural Dev.* 2012;7(1):4. doi:10.1186/1749-8104-7-4.
121. Koutcherov Y, Mai JK, Ashwell KWS, Paxinos G. Organization of human hypothalamus in fetal development. *J Comp Neurol.* 2002;446(4):301-324. doi:10.1002/cne.10175.
122. Aran A, Shors I, Lin L, Mignot E, Schimmel MS. CSF Levels of Hypocretin-1 (Orexin-A) Peak during Early Infancy in Humans. *Sleep.* 2012;35(2):187-. doi:10.5665/sleep.1618.
123. Hagman J, Travis A, Grosschedl R. A novel lineage-specific nuclear factor regulates mb-1 gene transcription at the early stages of B cell differentiation. *EMBO J.* 1991;10(11):3409-3417.
124. Kudrycki K, Stein-Izsak C, Behn C, Grillo M, Akeson R, Margolis FL. Olf-1-binding site: characterization of an olfactory neuron-specific promoter motif. *Mol Cell Biol.* 1993;13(5):3002-3014. doi:10.1128/MCB.13.5.3002.
125. Dubois L, Vincent A. The COE - Collier/Olf1/EBF - Transcription factors: Structural conservation and diversity of developmental functions. *Mech Dev.* 2001;108(1-2):3-12. doi:10.1016/S0925-4773(01)00486-5.
126. Malgaretti N, Pozzoli O, Bosetti A, et al. Mmot1, a new helix-loop-helix transcription factor gene displaying a sharp expression boundary in the embryonic mouse brain. *J Biol Chem.* 1997;272(28):17632-17639. doi:10.1074/jbc.272.28.17632.
127. Travis A, Hagman J, Hwang L, Grosschedl R. Purification of early-B-cell factor and characterization of its DNA-binding specificity. *Mol Cell Biol.* 1993;13(6):3392-3400. doi:10.1128/MCB.13.6.3392.
128. Treiber N, Treiber T, Zocher G, Grosschedl R. Structure of an Ebf1: DNA

- complex reveals unusual DNA recognition and structural homology with Rel proteins. *Genes Dev.* 2010;24(20):2270-2275. doi:10.1101/gad.1976610.
129. Corradi A, Croci L, Broccoli V, et al. Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice. *Development.* 2003;130:401-410. doi:10.1242/dev.00215.
  130. Moruzzo D, Nobbio L, Sterlini B, et al. The Transcription Factors EBF1 and EBF2 Are Positive Regulators of Myelination in Schwann Cells. *Mol Neurobiol.* 2016;1-11. doi:10.1007/s12035-016-0296-2.
  131. Chiara F, Badaloni A, Croci L, et al. Early B-cell factors 2 and 3 (EBF2/3) regulate early migration of Cajal-Retzius cells from the cortical hem. *Dev Biol.* 2012;365(1):277-289. doi:10.1016/j.ydbio.2012.02.034.
  132. Chuang SM, Wang Y, Wang Q, Liu KM, Shen Q. Ebf2 marks early cortical neurogenesis and regulates the generation of Cajal-Retzius neurons in the developing cerebral cortex. *Dev Neurosci.* 2012;33(6):479-493. doi:10.1159/000330582.
  133. Croci L, Chung S-H, Masserdotti G, et al. A key role for the HLH transcription factor EBF2COE2, O/E-3 in Purkinje neuron migration and cerebellar cortical topography. *Development.* 2006;133(14):2719-2729. doi:10.1242/dev.02437.
  134. Croci L, Barili V, Chia D, et al. Local insulin-like growth factor I expression is essential for Purkinje neuron survival at birth. *Cell Death Differ.* 2011;18(1):48-59. doi:10.1038/cdd.2010.78.
  135. Hoxha E, Tonini R, Montarolo F, Croci L, Consalez GG, Tempia F. Motor dysfunction and cerebellar Purkinje cell firing impairment in Ebf2 null mice. *Mol Cell Neurosci.* 2013;52:51-61. doi:10.1016/j.mcn.2012.09.002.
  136. Bizzoca A, Picocci S, Corsi P, et al. The gene encoding the mouse contactin-1 axonal glycoprotein is regulated by the collier/Olf1/EBF family early B-Cell factor 2 transcription factor. *Dev Neurobiol.* 2015;75(12):1420-1440. doi:10.1002/dneu.22293.
  137. Yang Q, Liu S, Yin M, Yin Y, Zhou G, Zhou J. Ebf2 is required for development of dopamine neurons in the midbrain periaqueductal gray matter of mouse. *Dev Neurobiol.* 2015;75(11):1282-1294. doi:10.1002/dneu.22284.
  138. Wang SS, Lewcock JW, Feinstein P, Mombaerts P, Reed RR. Genetic disruptions of O/E2 and O/E3 genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection. *Development.* 2004;131(6):1377-1388. doi:10.1242/dev.01009.
  139. Kieslinger M, Hiechinger S, Dobreva G, Consalez GG, Grosschedl R. Early B cell factor 2 regulates hematopoietic stem cell homeostasis in a cell-nonautonomous manner. *Cell Stem Cell.* 2010;7(4):496-507. doi:10.1016/j.stem.2010.07.015.

140. Mella S, Soula C, Morello D, Crozatier M, Vincent A. Expression patterns of the *coe/ebf* transcription factor genes during chicken and mouse limb development. *Gene Expr Patterns*. 2004;4(5):537-542. doi:10.1016/j.modgep.2004.02.005.
141. Kieslinger M, Folberth S, Dobreva G, et al. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2005;9(6):757-767. doi:10.1016/j.devcel.2005.10.009.
142. Jimenez MA, Akerblad P, Sigvardsson M, Rosen ED. Critical Role for Ebf1 and Ebf2 in the Adipogenic Transcriptional Cascade. *Mol Cell Biol*. 2006;27(2):743-757. doi:10.1128/MCB.01557-06.
143. Shapira SN, Lim HW, Rajakumari S, et al. EBF2 transcriptionally regulates brown adipogenesis via the histone reader DPF3 and the BAF chromatin remodeling complex. *Genes Dev*. 2017;31(7):660-673. doi:10.1101/gad.294405.116.
144. Rajakumari S, Wu J, Ishibashi J, et al. EBF2 determines and maintains brown adipocyte identity. *Cell Metab*. 2013;17(4):562-574. doi:10.1016/j.cmet.2013.01.015.
145. Garel S, Marín F, Mattéi MG, Vesque C, Vincent A, Charnay P. Family of Ebf/Olf-1-related genes potentially involved in neuronal differentiation and regional specification in the central nervous system. *Dev Dyn*. 1997;210(3):191-205. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199711)210:3<191::AID-AJA1>3.0.CO;2-B.
146. Honda M, Eriksson KS, Zhang S, et al. IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (orexin). *PLoS One*. 2009;4(1):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0004254.
147. Sánchez-García A, Cabral-Pacheco G, Zomosa-Signoret V, et al. Modular organization of a hypocretin gene minimal promoter. *Mol Med Rep*. 2017:1-8. doi:10.3892/mmr.2017.8142.
148. Theiler K. The House Mouse: Atlas of Embryonic Development. *Springer-Verlag*. 1989:178. doi:10.1007/978-3-642-88418-4.
149. Gascuel J, Lemoine A, Rigault C, et al. Hypothalamus-Olfactory System Crosstalk: Orexin A Immunostaining in Mice. *Front Neuroanat*. 2012;6(November). doi:10.3389/fnana.2012.00044.
150. Baldock R, Bard J, Davidson DR, Morriss-kay G. *Kaufman's Atlas of Mouse Development Supplement*. Elsevier; 2016.
151. Jennes L, Stumpf WE, Kalivas PW. Neurotensin: Topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J Comp Neurol*. 1982;210(3):211-224. doi:10.1002/cne.902100302.
152. Dobner PR, Fadel J, Deitemeyer N, Carraway RE, Deutch AY. Neurotensin-deficient mice show altered responses to antipsychotic drugs. *Proc Natl Acad Sci*

U S A. 2001;98(14):8048-8053. doi:10.1073/pnas.141042198.

153. Brown JA, Bugescu R, Mayer TA, et al. Loss of Action via Neurotensin-Leptin Receptor Neurons Disrupts Leptin and Ghrelin-Mediated Control of Energy Balance. *Endocrinology*. 2018;158(June):1271-1288. doi:10.1210/en.2017-00122.
154. Leininger GM, Opland DM, Jo Y, et al. Leptin Action via Neurotensin Neurons Controls Orexin , the Mesolimbic Dopamine System and Energy Balance. *Cell Metab*. 2011;14(3):313-323. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.016.
155. Wang MM, Tsai RY, Schrader KA, Reed RR. Genes encoding components of the olfactory signal transduction cascade contain a DNA binding site that may direct neuronal expression. *Mol Cell Biol*. 1993;13(9):5805-5813. doi:10.1128/MCB.13.9.5805.
156. Diez-Roux G, Banfi S, Sultan M, et al. A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS Biol*. 2011;9(1). doi:10.1371/journal.pbio.1000582.
157. Wei W, Motoike T, Krzeszinski JY, et al. Orexin regulates bone remodeling via a dominant positive central action and a subordinate negative peripheral action. *Cell Metab*. 2014;19(6):927-940. doi:10.1016/j.cmet.2014.03.016.
158. Tarasiuk A, Levi A, Assadi MH, Troib A, Segev Y. Orexin Plays a Role in Growth Impediment Induced by Obstructive Sleep Breathing in Rats. *Sleep*. 2016;39(4):887-897. doi:10.5665/sleep.5648.
159. Garcia-Dominguez M. Ebf gene function is required for coupling neuronal differentiation and cell cycle exit. *Development*. 2003;130(24):6013-6025. doi:10.1242/dev.00840.