

Hipocretinas, péptidos relacionados con la narcolepsia

Eric Murillo-Rodríguez* y Oscar Arias-Carrión

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

Recibido en su versión modificada: 1 de septiembre de 2006

Aceptado: 16 de febrero de 2007

RESUMEN

La narcolepsia es un trastorno del sueño caracterizado por excesiva somnolencia diurna, transiciones prematuras de la vigilia al sueño de movimientos oculares rápidos, alucinaciones hipnagógicas y cataplexia. Evidencias experimentales indican que la narcolepsia en humanos es una enfermedad neurodegenerativa asociada con la pérdida de neuronas hipocretinérgicas localizadas en el hipotálamo lateral. Además, se sabe que los pacientes narcolépticos presentan reducción significativa en la concentración de hipocretinas (HCRT) en el líquido cefalorraquídeo. Nuestro laboratorio ha generado un nuevo modelo experimental de narcolepsia en rata, que nos permite estudiar la enfermedad desde un enfoque histológico y neuroquímico. Hemos demostrado que la toxina hipocretina 2/saporina destruye selectivamente las neuronas hipocretinérgicas. Además, la pérdida de estas neuronas induce un cuadro conductual similar al observado en otros modelos experimentales o narcolepsia en humanos. En la presente revisión abordamos aspectos generales de la narcolepsia, del sistema hipocretinérgico, así como de los modelos experimentales de narcolepsia y el uso de los trasplantes como alternativa para tratar la enfermedad.

Palabras clave:

Hipotálamo lateral, líquido cerebrospinal, narcolepsia, hipocretinas, saporina, trasplante

SUMMARY

Narcolepsy is a chronic disease characterized by excessive somnolence, abrupt transitions from wakefulness to rapid eye movement sleep stage and cataplexy. Experimental evidence show that narcolepsy in humans is a neurodegenerative disease associated with the loss of hypocretin (HCRT) neurons in the lateral hypothalamus. Narcoleptic patients also display a significant diminution in HCRT contents of cerebrospinal fluid. In order to study narcolepsy, several experimental models have been developed. Murine and canine models currently allow us to study this disease. Our laboratory has developed a new experimental rat model of narcolepsy. This model allows us to study the disease from a histological and neurochemical perspective. Elsewhere we have reported that the use of the toxin hypocretin2/saporine (HCRT2/SAP) selectively destroys hypocretinergic neurons. The loss of these neurons induces a similar behavioural profile as the one observed in other experimental models of narcolepsy. In the present review we describe an overview on narcolepsy, the hypocretinergic system, experimental models in narcolepsy and the use of transplants as an alternative therapeutic tool.

Key words:

Lateral hypothalamus, cerebrospinal fluid, narcolepsy, hypocretins, saporin, transplants

Introducción

Las hipocretinas (HCRT1 y HCRT2, conocidas también como orexina A y B, respectivamente) son dos péptidos derivados del mismo precursor, el cual se expresa de manera restrictiva en neuronas del hipotálamo lateral.¹⁻⁴ La HCRT1 consiste en una cadena de 33 aminoácidos, mientras que HCRT2 está constituida por una molécula de 28 aminoácidos.

Distribución de las HCRT en el sistema nervioso central

Se ha demostrado que las neuronas que contienen HCRT se localizan exclusivamente en el fórnix e hipotálamo lateral. A partir de estas regiones, las neuronas HCRT envían diversas

proyecciones a todo el sistema nervioso central, incluyendo regiones relacionadas con la regulación del ciclo sueño-vigilia. Entre éstas, en el cerebro basal tenemos el núcleo tuberomamilar, mientras que en el tallo cerebral tenemos al núcleo dorsal del rafe, *locus coeruleus* y el complejo PPT/LDT.^{1, 2, 5-7}

Estas proyecciones activan neuronas serotoninérgicas,^{8,9} noradrenérgicas,¹⁰ histaminérgicas,¹¹ colinérgicas,¹² así como al núcleo tegmental laterodorsal¹³ y tálamo-cortical.¹⁰ Como ya se refirió, existen proyecciones al cerebro basal anterior, incluyendo el área preóptica medial y el septum.³ Como se puede apreciar, las neuronas HCRT proyectan a los principales centros que regulan el alertamiento. De este modo podemos suponer que las proyecciones HCRT tienen un papel activo en la modulación de los diversos centros del despertar.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Eric Murillo-Rodríguez. Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D. F, México. Tel.: +52 (55) 5622-5733. Fax: 5622 5607.

Narcolepsia e HCRT

La narcolepsia se define como una enfermedad neurológica caracterizada por excesiva somnolencia diurna, transiciones prematuras de la vigilia al sueño de movimientos oculares rápidos (SMOR) y cataplexia (periodos en los cuales el sujeto presenta pérdida de tono muscular sin pérdida de la conciencia).¹⁴

La relación entre HCRT y narcolepsia se originó cuando en el ratón se descubrió una mutación en el receptor para HCRT, que provocaba arrestos conductuales los cuales posteriormente fueron denominados *ataques narcolépticos*.⁷ El mismo fenómeno se describió en una raza de perros que no expresaba el receptor a HCRT.¹⁵

En 2000, Peyron y colaboradores encontraron en un estudio post mórtem de pacientes que habían cursado con narcolepsia, una reducción masiva de neuronas HCRT en el hipotálamo lateral (85-98%) a diferencia de sujetos sanos sin narcolepsia y que habían fallecido por otras razones.¹⁶ Este dato fue corroborado por otro grupo de investigación que llegó a una conclusión semejante.¹⁷

Por otro lado, diversos estudios demostraron que los niveles de HCRT se encontraban disminuidos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes que presentaban narcolepsia.¹⁸⁻²³ Esto representaba un resultado excitante, ya que la disminución se correlacionaba con la pérdida de neuronas HCRT. Actualmente la medición de HCRT en LCR de pacientes en quienes se sospecha puedan desarrollar narcolepsia, ha representado una estrategia médica confiable para la detección temprana de la enfermedad.^{20,23}

Modelos experimentales de narcolepsia

En la actualidad existen algunos modelos experimentales de narcolepsia, por ejemplo, el modelo del ratón *knock-out*,⁷ el modelo canino que presenta una mutación en el receptor a HCRT,¹⁵ así como el modelo del ratón que carece de neuronas HCRT.²⁴ En todos, los animales presentan un cuadro conductual similar al de narcolepsia.

Nuestro laboratorio ha generado un modelo experimental de narcolepsia en rata. El modelo consiste en el uso de una toxina denominada saporina (SAP)²⁵ la cual es conjugada al receptor HCRT2. La SAP se une a la neurona que presente el receptor a HCRT2 e induce una destrucción de la misma. Dado que la HCRT2/SAP se une exclusivamente a neuronas que expresen el receptor a HCRT2, representa un modelo confiable. La destrucción de neuronas HCRT mediante la HCRT2/SAP induce cambios conductuales en el sueño como alteraciones en los ritmos de la vigilia, del sueño de ondas lentas (SOL) y del SMOR. Entonces podemos asegurar que la HCRT2/SAP al destruir las neuronas HCRT genera una alteración conductual similar a la narcolepsia.

Empleando este modelo, Geraschchenko y colaboradores demostraron en 2001, que la HCRT2/SAP inducía un incremento de SOL y SMOR durante la fase de oscuridad, periodo en el cual las ratas normalmente permanecen más activas. Además, se encontraron múltiples periodos de con-

ductas aberrantes (arrestos conductuales) en los animales lesionados. Un punto importante es que el empleo de HCRT2/SAP inyectada directamente en el hipotálamo lateral causaba decremento significativo en el número de neuronas HCRT dependiendo de la dosis empleada, así como una inducción de narcolepsia²⁷ (Figura 1).

Hasta el momento, la evidencia sugería que el uso de HCRT2/SAP inducía un cuadro semejante a la narcolepsia observada en humanos y en los modelos experimentales del ratón y el perro.^{26,27}

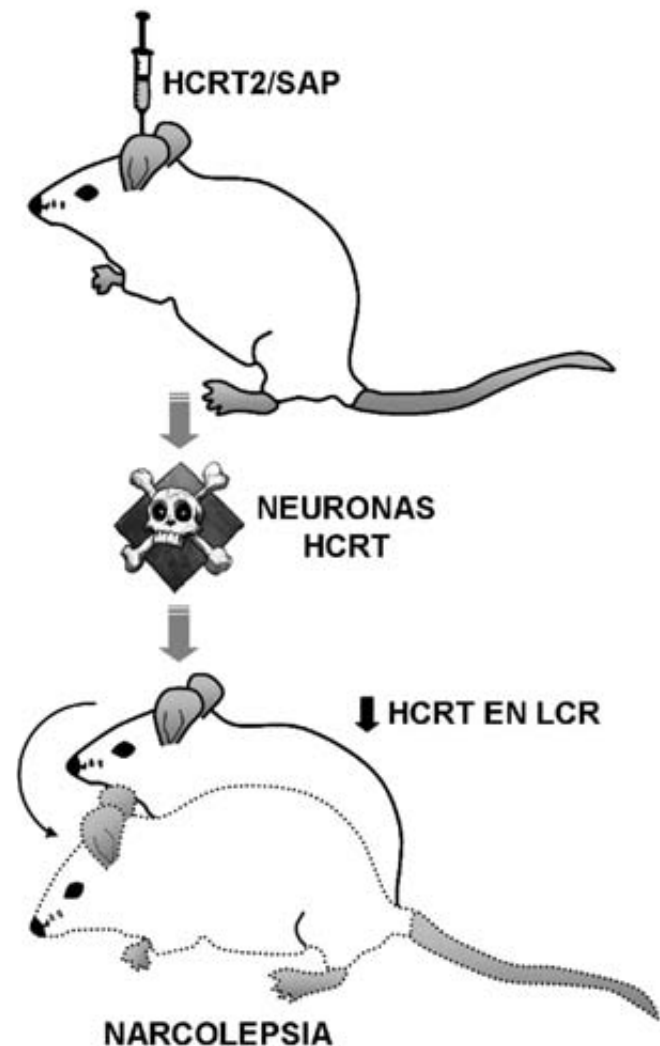


Figura 1. Esquema que representa el diseño experimental de la inyección de HCRT2/SAP en el hipotálamo lateral de ratas. La administración de HCRT2/SAP induce muerte de neuronas hipocretinérgicas (HCRT) así como disminución en los niveles de HCRT en el líquido cefalorraquídeo. Como consecuencia conductual, los animales desarrollan narcolepsia.

Relación entre el número de neuronas HCRT y niveles de HCRT en LCR

A pesar de que la HCRT2/SAP destruía efectivamente neuronas HCRT, se desconocía la relación entre la pérdida de las neuronas y los cambios en niveles del mismo péptido en LCR. De tal modo que empleando la HCRT2/SAP, lesionamos a las neuronas HCRT del hipotálamo lateral y encontramos que dicha manipulación experimental inducía una reducción de 50% de HCRT en niveles de LCR. Esto significaba que 73% de neuronas HCRT perdidas por la lesión ocasionaban un decremento de 50% de este péptido en LCR. Este dato indican el número de neuronas HCRT que se pierden y que parece son necesarias para la generación de la narcolepsia. Además, esta disminución era acompañada por un decremento en el número de neuronas HCRT (73% de neuronas perdidas).²⁸

Por otro lado, estudios llevados a cabo por Wu y colaboradores en 2002 demostraron que la privación de sueño incrementaba los niveles de HCRT en LCR en animales normales.²⁹ Nosotros decidimos probar la hipótesis de que esta manipulación experimental modificaría los niveles de HCRT en LCR en animales lesionados. Los resultados mostraron que los niveles de HCRT en LCR no se incrementaron durante seis horas de privación total de sueño en animales lesionados. Tal parecería que las neuronas que habían sobrevivido a la HCRT2/SAP no eran suficientemente eficaces para compensar los niveles de HCRT disminuidos en el fluido biológico analizado.

En ese mismo estudio mostramos que los niveles de HCRT en LCR determinados a diferentes tiempos del ciclo luz-oscuridad, estaban disminuidos comparados con el respectivo control. Los animales que habían presentado 72% de muerte de células HCRT habían mostrado un patrón circadiano sin cambios en los valores de HCRT en LCR.²⁸ Es decir, los animales lesionados no mostraban un ritmo circadiano en los niveles de HCRT en LCR. Esto parece indicar que la pérdida de neuronas HCRT no nada más induce disminución de HCRT en LCR, sino que el ciclo del péptido se había perdido.

HCRT y envejecimiento

Por otro lado, la presencia de neuronas HCRT ha sido determinada desde etapas muy tempranas del desarrollo.^{30,31} Además, se ha reportado que las HCRT muestran variaciones diurnas en LCR en animales jóvenes.^{32,33} Sin embargo, la ritmicidad del sistema hipocretinérgico no había sido descrita en animales envejecidos. Con esa idea, nuestro grupo decidió determinar los niveles de HCRT en LCR en animales envejecidos. Las muestras fueron colectadas en intervalos de 4 horas durante todo el ciclo luz-oscuridad. Los resultados obtenidos mostraron que los animales jóvenes presentaban un pico máximo de HCRT en LCR al final del periodo activo de la rata, resultado respaldado por estudios previos.³² Sin embargo, encontramos que los animales envejecidos presentaban una disminución significativa en sus niveles de HCRT comparados con las ratas jóvenes a lo largo del ciclo luz-oscuridad.³⁴

Como ya mencionamos, los niveles de HCRT en LCR se encontraban incrementados en respuesta a la privación total de sueño. Sin embargo, no teníamos información sobre el perfil de HCRT en LCR en animales envejecidos. Después de mantener despiertas a las ratas envejecidas por un periodo de ocho horas, encontramos que los niveles de HCRT en LCR en dichos animales presentaban un incremento. Dicho aumento era significativo comparado con los mismos animales envejecidos; si la comparación se realizaba con el grupo de animales jóvenes, entonces se apreciaba disminución en los niveles de HCRT en LCR después de la privación de sueño.³⁴

Podría pensarse que los niveles de HCRT en LCR de animales envejecidos eran menores comparados con los jóvenes, ya que probablemente en los animales viejos hay disminución en el número de neuronas HCRT. Al medir el RNA-m de la prepro-HCRT en el hipotálamo lateral de los animales envejecidos no encontramos diferencias entre estos animales y las ratas jóvenes;³⁴ de tal modo, dicha explicación fue descartada. Aún permanece la incógnita sobre la explicación a este fenómeno.

Terapias actuales para tratar la narcolepsia

Las terapias que se emplean para el tratamiento de la narcolepsia tienen como principal objetivo controlar los síntomas de la misma y permitir que el paciente continúe con su vida y actividades cotidianas. Los tratamientos farmacológicos incluyen el uso de anfetaminas y antidepresivos. Un fármaco utilizado de manera exitosa es el modafinil, el cual no genera dependencia ni tolerancia al mismo.^{20,35,36}

Recientemente Arias Carrión y colaboradores (2004) demostraron que los trasplantes de células HCRT sobrevivían por un periodo considerable en la rata.³⁷ Con este dato se abre un nuevo camino al tratamiento de la narcolepsia: los trasplantes.

Los trasplantes de neuronas HCRT

En nuestro estudio preliminar, células HCRT obtenidas del hipotálamo lateral de ratas neonatas transplantadas en el puente de ratas adultas, sobrevivían hasta 36 días postransplante. Los animales control recibieron tejido cerebelar carente de neuronas HCRT. En el experimento, los animales transplantados se sacrificaron a diferentes intervalos de tiempo: 1, 3, 6, 9, 12, 24, y 36 días después del trasplante. Una vez obtenido el cerebro y procesado para el estudio de inmunohistoquímica para la detección de HCRT, se identificaron las neuronas que eran inmunorreactivas a HCRT en el área transplantada.

Claramente se demostró la presencia de células HCRT en el sitio del trasplante a los días 1, 3 y 6 días después del trasplante. Las neuronas HCRT transplantadas mostraban un fenotipo muy semejante al de una neurona HCRT madura y saludable. Como se esperaba, no encontramos inmunorreactividad para HCRT en los animales control. La presencia de neuronas HCRT en el puente también estaba en los

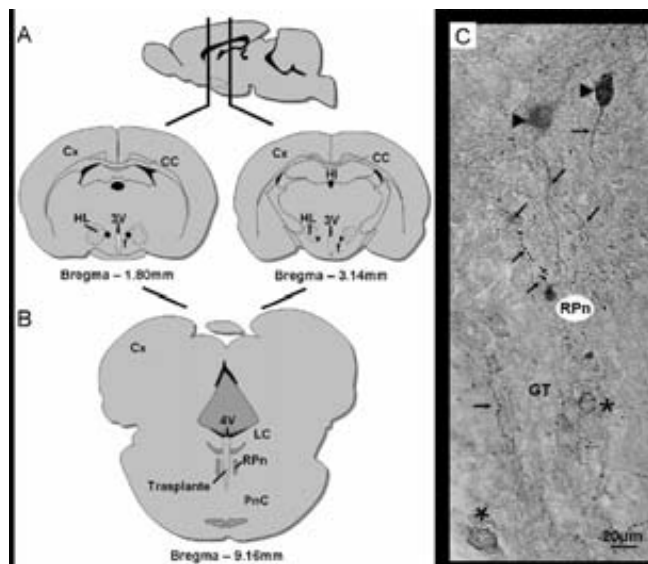


Figura 2. A) Representación de secciones del sistema nervioso central de ratas donadoras las cuales contienen neuronas HCRT localizadas en el hipotálamo lateral; dichas secciones son empleadas para el trasplante. B) Área en la cual se realiza trasplante de neuronas HCRT. C) Microfotografía que muestra que en el área transplantada, neuronas HCRT sobrevivieron 12 días postrasplante. 3V=tercer ventrículo, 4V=cuarto ventrículo, Cx=corteza cerebral, CC=cuerpo calloso, f=fórnix, HL=hipotálamo lateral, LC=locus coeruleus, PnC=núcleo reticular pontino, RPn= núcleo raphe.

animales sacrificados a los 9, 12, 24, y 36 días, aunque se encontró disminución significativa del número de neuronas transplantadas en los últimos días.³⁷ Es importante señalar que la identificación de las neuronas HCRT en el área transplantada se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica, y que aún existen preguntas por contestar: ¿las neuronas HCRT transplantadas son electrofisiológicamente activas?, ¿liberan HCRT?

Sin lugar a dudas estos resultados representan una nueva perspectiva para el tratamiento de la narcolepsia, si bien se requiere mayor información experimental sobre el porcentaje de neuronas HCRT que sobreviven después de los trasplantes (Figura 2).

Conclusiones

La narcolepsia es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por ataques de sueño. Modelos experimentales desarrollados en roedores y caninos han demostrado que existe una relación entre el sistema de HCRT y la narcolepsia.^{7,15}

La evidencia actual señala que la narcolepsia en humanos y en los modelos experimentales está ligada a disfunción del sistema de HCRT, tanto de receptores como en los niveles de HCRT en LCR.^{7, 15-17, 21, 24}

Nuestro grupo ha desarrollado un modelo experimental de narcolepsia en rata.²⁶ El uso de la toxina HCRT2/SAP destruye las neuronas que expresan el receptor para HCRT, lo cual induce un cuadro conductual semejante a la narcolepsia. Además, hemos demostrado la correlación entre el número de neuronas HCRT y niveles de HCRT en LCR después del uso de HCRT2/SAP.²⁷

Finalmente, reportamos que el trasplante de neuronas HCRT en el tallo cerebral de ratas sobrevive hasta 36 días postrasplante.³⁷ Este dato representa una potencial estrategia para el reemplazo de neuronas HCRT perdidas como resultado de la narcolepsia.

Agradecimientos

El presente estudio fue apoyado por UNAM/DGAPA/PAPIIT (IN208206-2) y el FIDEICOMISO UNAM.

Referencias

1. Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 1998;438:71-75.
2. Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 2001;103:777-797.
3. España RA, Reis KM, Valentino RJ, Berridge CW. Organization of hypocretin/orexin efferents to locus coeruleus and basal forebrain arousal-related structures. *J Comp Neurol* 2005; 481(2):160-178.
4. De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *USA: Proc Natl Acad Sci* 1998;95 (1):322-327.
5. Peyron C, Tighe DK, Van den Pol AN, De Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998;18:9996-10015.
6. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998;92:573-585.
7. Chemelli JT, Willie CM, Sinton JK, Elmquist T, Scammell C, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999;98:437-451.
8. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998;92:573-585.
9. Chemelli JT, Willie CM, Sinton JK, Elmquist T, Scammell C, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999;98:437-451.
10. Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, et al. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(19):10911-10916.
11. Brown RE, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL. Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline). *J Neurosci* 2002;22(20):8850-8859.
12. Bayer L, Eggermann E, Saint-Mieux B, Machard D, Jones BE, Muhlethaler M, et al. Selective action of orexin (hypocretin) on nonspecific thalamocortical projection neurons. *J Neurosci* 2002;22(18):7835-7839.
13. Bayer L, Eggermann E, Serafin M, Saint-Mieux B, Machard D, Jones B, et al. Orexins (hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons. *Eur J Neurosci*. 2001;14(9):1571-1575.
14. Eggermann E, Serafin M, Bayer L, Machard D, Saint-Mieux B, Jones BE, et al. Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurons. *Neuroscience* 2001;108(2):177-181.
15. Takahashi K, Koyama Y, Kayama Y, Yamamoto M. Effects of orexin on the laterodorsal tegmental neurons. *Psychiatry Clin Neurosci* 2002;56(3):335-336.
16. Siegel JM. Hypocretin (orexin): role in normal behavior and neuropathology. *Annu Rev Psychol* 2004;55:125-148.
17. Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 1999;98:365-376.

16. **Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, et al.** A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 2000;6:991-997.
17. **Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, et al.** Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 2000;27:469-474.
18. **Dalal MA, Schuld A, Haack M, Uhr M, Geisler P, Eiseensehr I, et al.** Normal plasma levels of orexin A (hypocretin-1) in narcoleptic patients. *Neurology* 2001;56:1749-1751.
19. **Kanbayashi T, Inoue Y, Chiba S, Aizawa R, Saito Y, Tsukamoto H, et al.** CSF hypocretin-1 (orexin-A) concentrations in narcolepsy with and without cataplexy and idiopathic hypersomnia. *J Sleep Res* 2002;11:91-93.
20. **Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, Okun M, Nevsimalova S, Overeem S, et al.** The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol* 2002;59:1553-1562.
21. **Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ and Mignot E.** Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 2000;355:39-40.
22. **Nishino S, Ripley B, Overeem S, Nevsimalova S, Lammers GJ, Vankova J, et al.** Low cerebrospinal fluid hypocretin (orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy. *Ann Neurol* 2001;50:381-388.
23. **Ripley B, Overeem S, Fujiki N, Nevsimalova S, Uchino M, Yesavage J, et al.** CSF hypocretin/orexin levels in narcolepsy and other neurological conditions. *Neurology* 2001;57:2253-2258.
24. **Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, et al.** Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 2001;30:345-354.
25. **Stirpe F, Gasper-Campani A, Barbieri L, Falasca A, Abbondanza A, Stevens WA.** Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle), and of *Asparagus officinalis* (asparagus) and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree). *Biochem J* 1983;216:617-625.
26. **Gerashchenko D, Kohls MD, Greco M, Waleh NS, Salin-Pascual R, kILDUFF ts, et al.** Hypocretin-2-saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat. *J Neurosci* 2001;21(18):7273-7283.
27. **Gerashchenko D, Blanco-Centurion C, Greco MA and Shiromani PJ.** Effects of lateral hypothalamic lesion with the neurotoxin hypocretin2-saporin on sleep in Long Evans rats. *Neuroscience* 2003;116:223-235.
28. **Gerashchenko D, Murillo-Rodríguez E, Lin L, Xu M, Hallett L, Nishino S, et al.** Relationship between CSF hypocretin levels and hypocretin neuronal loss. *Exp Neurol* 2003;184(2):1010-1016.
29. **Wu MF, John J, Maidment N, Lam HA, Siegel JM.** Hypocretin release in normal and narcoleptic dogs after food and sleep deprivation, eating, and movement. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283(5):R1079-R1086.
30. **Yamamoto Y, Ueta Y, Hara Y, Serino R, Nomura M, Shibuya I, et al.** Postnatal development of orexin/hypocretin in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 2000 78:108-119.
32. **Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, Honda K, Mignot E, Nishino S.** Changes in CSF hypocretin-1 (orexin a) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation. *Neuroreport* 2001;12:993-997.
33. **Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, et al.** Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin a) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci* 2001;14:1075-1081.
34. **Desarnaud F, Murillo-Rodríguez E, Lin L, Xu M, Gerashchenko D, Shiromani SN, et al.** The diurnal rhythm of hypocretin in young and old F344 rats. *Sleep* 2004;27(5):851-856.
35. **Scammell TE.** The neurobiology, diagnosis, and treatment of narcolepsy. *Ann Neurol* 2003;53:154-166.
36. **Mignot E, Nishino S.** Emerging therapies in narcolepsy-cataplexy. *Sleep* 2005;28:754-763.
37. **Arias-Carrión O, Murillo-Rodríguez E, Xu M, Blanco-Centurión C, Drucker-Colín R, Shiromani PJ.** Transplantation of hypocretin neurons into the pontine reticular formation: preliminary results. *Sleep* 2004;27:1465-1470.