

I
612.82
MCG

T 612.82
MCG

Universidad de la República
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas
Area Biología

Tesis para acceder a la Maestría en Ciencias Biológicas,
opción Neurociencias

“Estudio de las proyecciones suprasegmentarias al núcleo
motor del trigémino en el cobayo (*Cavia Porcellus*)”

Ronald McGregor Armas

Laboratorio de Neurofisiología Celular
Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad de la República



Nº 11814

Orienteador
Prof. Dr. Francisco R. Morales

I
612.82 MCG
Estudio de las proyeccion...
McGregor Armas, Ronald



FC/11814

Donación del autor 3/10/2006.

Agradecimientos

A quien debo de agradecer sino a todo lo que conforma el infinito entramado de personas, sucesos y lugares sobre los cuales se erige nuestra historia individual, pues esto es solamente una consecuencia de aquello. Son las copas y los puchos retratados en la madrugada de un día sin identidad, los boliches y las noches sembradas de sabia elocuencia etílica, los hermosos mundos que se esconden detrás del espejo..., la risa compartida y la mirada cómplice, la lágrima en el silencio aplastante de una hora complicada. El Profeta y el elogio de la locura, nuestra noble infusión, el ocaso de un día perfecto, la inmensidad de la bóveda negra, y así ... todos los pequeños detalles que vuelven perceptible la imperceptible línea de la diferencia.

INDICE

ABREVIATURAS	3
PRÓLOGO	5
Acerca del sistema nervioso	5
Breve reseña histórica. El hipotálamo	7
INTRODUCCIÓN	11
El hipotálamo	12
Sistema MCHérgico	13
Sistema hipocretinérgico	14
Antecedentes particulares	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Preparación del material para el estudio morfológico	20
Métodos histotecnológicos: inmunohistoquímica e histoenzimología	21
Análisis	27
RESULTADOS	29
Neuronas premotoras hipotalámicas	30
Neuronas inmunopositivas para la CTb	30
Neuronas premotoras glutamatérgicas	32
Neuronas premotoras nitrérgicas	32
Neuronas premotoras hipocretinérgicas	33
Neuronas premotoras MCHérgicas	34
DISCUSIÓN	36
Consideraciones metodológicas	36
Distribución en el hipotálamo	37
Posibles acciones sinápticas de la inervación hipotalámica sobre las motoneuronas trigeminales	38
Implicancias comportamentales de la existencia de una región premotora en el hipotálamo.	40
Conclusiones finales	41
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXO I	60
ANEXO II	68
Amígdala	68

Introducción	68
Resultados	69
Neuronas inmunopositivas para CTb	70
Fenotipo de las neuronas premotoras	70
Discusión	71
Sustancia Nigra	73
Introducción	73
Resultados	74
Neuronas inmunopositivas para CTb	74
Fenotipo de las neuronas premotoras	75
Discusión	75

ABREVIATURAS

ABC: complejo avidina-biotina
AH: núcleo hipotalámico anterior
AP: anteroposterior
Arc: núcleo arcuato
BSA: "bovine serum albumin"
CART: transcripto relacionado con la cocaína y la anfetamina
CeA: núcleo central de la amígdala
cGMP: guanosina 3,5-monofosfato cíclico
ChAT: enzima acetilcolina transferasa
CTb: subunidad B de la toxina colérica
DAG: "donkey anti-goat serum"
DAB: diaminobencidina tetrahidroclorada
DMH: núcleo hipotalámico dorsomedial
GABA: ácido gama aminobutírico
GAD: enzima glutamato decarboxilasa
Glut: glutamato
H: dorsoventral
Hcr: hipocretina
HcrA: isoforma A de la hipocretina
HcrB: isoforma B de la hipocretina
HcrR1: receptor para la hipocretina tipo 1
HcrR2: receptor para la hipocretina tipo 2
IgG: inmunoglobulinas
L: lateromedial
LH: área hipotalámica lateral
LHa: área hipotalámica lateral anterior
LHp: área hipotalámica lateral mamilar
LHt: área hipotalámica lateral tuberal
LPO: área preóptica lateral
MCH: hormona concentradora de melanina
MCHR1: receptor para MCH tipo 1
MCHR2: receptor para MCH tipo 2
mV: núcleo motor del trigémino (V par craneano)
mXII: núcleo motor del hipogloso (XII par craneano)
NADPH-d: enzima diaforasa dependiente de NADPH
NBT: sal de "nitroblue tetrazolium"
NDS: suero normal de burro
nNOS: isoforma neuronal de la sintasa de óxido nítrico
NO: óxido nítrico
NP-Y: neuropéptido-Y
PB: buffer fosfato
PBS: buffer fosfato de sodio
PBST: buffer fosfato salino con tritón X-100, 0.3 %
PeA: núcleo periventricular anterior

PEF: núcleo perifornical
PeI: núcleo periventricular intermedio
PHA: área hipotalámica posterior
SCh: núcleo supraquiasmático
SNC: sistema nervioso central
SNpr: sustancia nigra pars reticulada
TH: enzima tirosina hidroxilasa
TU: núcleo tuberal
VMH: núcleo hipotalámico ventromedial
VMHC: núcleo hipotalámico ventromedial central
VMHDM: núcleo hipotalámico ventromedial dorsomedial
VMHVL: núcleo hipotalámico ventromedial ventrolateral

Prólogo

Cuando el estudiante inexperto, por voluntad propia o siguiendo ya un camino marcado por otros, se encuentra de repente en la necesidad de resumir su trabajo, en el que tanto ahínco ha puesto, pretende no olvidar ningún detalle por pequeño que este sea. Durante el progreso de su escritura, advierte en un momento que a lo largo de su investigación los objetivos captaron su atención en grado tal que olvidó por completo la visión global, única que permite observar los elementos integrados en un conjunto. Es así que su mente comienza su lento camino hacia el despertar, al principio tímido, luego incontenible, que lo guía hacia un universo siempre presente pero hasta el momento ignorado.

Acerca del sistema nervioso

Eráclito el oscuro, un filósofo presocrático, propuso hace ya más de 26 siglos el concepto del mundo como una estructura en permanente cambio. Su conocida frase "nada es, todo cambia" resume de alguna manera sus complejos razonamientos en este tema. En este dinámico escenario de permutaciones constantes, de combinaciones casi infinitas, se desarrollaron y evolucionaron un sinnúmero de complejas máquinas biológicas. Desde su creación, estos sistemas biológicos desarrollaron diferentes estrategias para asegurar su estabilidad y su permanencia a través del tiempo. Algunos optaron por formar asociaciones, con sus pares o competidores, con el objetivo de aumentar así sus probabilidades de supervivencia. Lentamente, estas primitivas asociaciones fueron adquiriendo mayor complejidad, lo que supuso una división de tareas con el objetivo de aumentar la eficiencia en el mantenimiento de la comunidad. Así entonces, de los diferentes constituyentes comenzaron a surgir estructuras cada vez más especializadas, con funciones más específicas. El compromiso indisoluble, que los retos y el tiempo modelarían, se dió en llamarse evolución.

La capacidad adaptativa aumentada de estos individuos se manifestó en el éxito

para alcanzar dos preceptos biológicos imperativos para cualquier organismo: asegurar su supervivencia y propagar su especie. Para lograr estos cometidos en un contexto de fluctuaciones constantes, los organismos deben poseer la capacidad para coordinar un número complejo de variables fisiológicas e integrarlas de tal manera que resulten en una respuesta acorde a los desafíos planteados.

En organismos unicelulares, estos procesos incluyen por ejemplo la regulación osmótica mediante la utilización de vacuolas contráctiles, o la reacción de escape frente a situaciones de pH poco favorables. A medida que la complejidad de los organismos aumenta, la cantidad de variables a controlar también se ve incrementada, para lo cual el número y especialización de los sistemas de monitoreo y ajuste sufre una concomitante elevación. Así nace la necesidad de un sistema que centralice y procese toda la información relevante, y que a su vez pueda actuar en consecuencia. Surge entonces el sistema nervioso quien detecta, procesa y coordina la información proveniente del medio interno y externo del individuo, integrándolas en la generación de una respuesta coherente.

Sus primeros vestigios, que se han mantenido hasta el presente, los podemos hallar en la familia de los Cnidarios, particularmente en ciertas anémonas. Su primitivo sistema nervioso está compuesto por neuronas únicas dispuestas de manera que establezcan una línea de comunicación entre la capa epitelial (el sector más externo del organismo) y la capa muscular (dispuesta internamente). De este sistema de neurona única, la evolución optó por generar formas con dos componentes neuronales. Se mantuvo la neurona que comunicaba la superficie con los sectores más profundos pero también se estableció una red de neuronas subepiteliales que actuarían como mediadores entre los estímulos externos y los tejidos profundos, confiriendo un mayor grado de sofisticación al sistema. De esta manera las neuronas de las capas epiteliales establecen contacto con las neuronas de la red subepitelial y estas a su vez contactan con los tejidos contráctiles. El siguiente paso evolutivo queda determinado por la aparición de un tercer tipo de neurona cuyas características le permiten hacer contacto solamente con células de su propio tipo. Así comunican a las neuronas sensoriales que reciben la información proveniente del exterior, con las motoneuronas que se encuentran en contacto directo con los tejidos efectores. Este tercer tipo de neurona pertenece a lo que

Nauta (1986) definió como la red intermedia. El reconocimiento de esta red intermedia en organismos con redes neuronales difusas puede tornarse dificultoso, no así en animales con mayor grado de evolución. Estos pueden presentar polarización con una lógica céfalo-caudal evidente, simetría bilateral y una red neuronal subepitelial que optó por una organización del tipo ganglionar o en un único sistema nervioso central (SNC). La estrategia evolutiva que se resolvió con el desarrollo de un SNC de la que los vertebrados forman parte, fue la que en definitiva creó las formas de vida que nosotros consideramos más complejas.

Breve reseña histórica. El hipotálamo.

Para cualquier organismo, el mantenimiento de lo que el fisiólogo Claude Bernard denominó el medio interno es esencial. La composición de este medio interno debe mantenerse para asegurar el correcto funcionamiento de la maquinaria biológica. Sin embargo, la mantención de las distintas variables fisiológicas en valores inflexibles, resultaría en una drástica disminución de la capacidad adaptativa del organismo. En su lugar, estas variables deberían ser modificables para poder responder efectivamente a los retos del medio. Surge entonces el vocablo homeostasis, introducido por Walter Cannon. Este término denomina a la batería de mecanismos encargados de mantener las variables fisiológicas en un rango de valores funcionales, a pesar de los cambios, internos y/o externos, a los que el organismo está sometido.

En los vertebrados superiores existe una estructura del SNC denominada hipotálamo, que puede considerarse clave en el mantenimiento de la homeostasis. En los orígenes de la investigación y sistematización del sistema nervioso, el hipotálamo fue omitido de los atlas por considerarlo una estructura sin importancia. Fue Wilhelm His (1893) en sus trabajos acerca del SNC, que por primera vez lo reconoció como una división del diencefalo.

Años más tarde, Harvey Cushing un neurocirujano pionero en el estudio de los desórdenes endocrinos, realizó varios estudios sobre el hipotálamo, llegando a reconocer una unidad funcional formada entre éste y la glándula hipófisis. En 1929 resumía en esta frase su concepto sobre el hipotálamo: "En este punto oculto, que puede

ser cubierto casi completamente por la uña del pulgar, yace la principal fuente de la existencia primitiva - vegetativa, emocional, reproductiva- sobre la cual con mayor o menor éxito el hombre sobreimpuso una corteza de inhibiciones” (Zigmond et al., 1999).

Hoy sabemos que el hipotálamo forma parte del sistema endócrino como glándula de secreción interna. Posee una población neuronal, cuyos terminales axónicos forman parte de la neurohipófisis, que descargan su contenido neuropeptidérgico al sistema circulatorio. Además, controla la actividad de la adenohipófisis a través de la síntesis de diferentes moléculas señalizadoras que liberadas al sistema portahipofisario alcanzan su diana. Aunque el sistema endócrino es uno de los protagonistas en el mantenimiento de la homeostasis, en el presente trabajo no abordaremos su descripción debido a que nos centraremos en otras funciones del hipotálamo.

Basados en los resultados de los primeros estudios, varios investigadores comenzaron a profundizar en la caracterización del hipotálamo tanto en el plano anatómico como en el fisiológico. A finales de la década del 20 y durante la década del 30 del siglo XX, Grudijian (1927), Kreig (1932) y LeGros Clarke y colaboradores (1938) describieron, mediante la utilización de técnicas histológicas, la citoarquitectura, la organización celular y los núcleos hipotalámicos. Por aquellos mismos años, W.R. Hess en Zurich, realizaba experimentos con estimulación eléctrica en diferentes zonas del hipotálamo de gatos. En estos trabajos, el investigador con sólo dirigirse a diferentes regiones del hipotálamo podía provocar reacciones de ataque que incluían un componente de furia, así como reacciones de defensa que demostraban un componente de miedo. Sus extensos estudios sobre la estimulación eléctrica de la región diencefálica en gatos, reportaron resultados sobre la modificación de conductas vegetativas como por ejemplo la regulación de la presión arterial, la dilatación pupilar, la salivación, la micción y cambios en la alimentación (Hess, 1954).

En cuanto a la relación del hipotálamo con la alimentación y el sueño se describieron hace ya varias décadas la existencia de regiones excitatorias como inhibitorias de ambos comportamientos. Los trabajos de Brobeck (1946) demostraron que la lesión bilateral en la vecindad del núcleo ventromedial del hipotálamo duplicaba o triplicaba el consumo de alimentos; mientras que lesiones similares producidas más lateralmente resultaban en inanición (Anand y Borbeck, 1951; Teitelbaum y Stellar,

1954). La confirmación de que la región medial del hipotálamo constituía un centro inhibitorio, mientras que la región lateral constituía un sector excitador de la alimentación llegó con los experimentos en animales con electrodos crónicamente implantados. En estos estudios, la estimulación de la región medial provocaba una disminución en la alimentación, mientras que la misma estimulación más lateral generaba hiperfagia (Larsson, 1954).

Con respecto al sueño, ya en 1917 von Economo definía, frente a la Sociedad Vienesa de Psiquiatría y Neurología, la encefalítis letárgica, una enfermedad del sistema nervioso. Dentro de sus manifestaciones clínicas presentaba perturbaciones en el ciclo sueño vigilia, tema este de particular interés para el investigador. Basándose en sus investigaciones sobre la anatomía patológica del tejido obtenido de pacientes víctimas de esta enfermedad, planteó con respecto al tema que “desde el núcleo del tercer nervio cranial, en dirección rostral, en los sectores de transición desde el mesencéfalo al diencefalo, deben de existir masas de sustancia gris que ejerzan una influencia primaria en la inducción y el desarrollo del sueño”. Años más tarde, se demostraba que lesiones discretas en el sector posterior del hipotálamo, en la región de los cuerpos mamilares generaba somnolencia (Nauta, 1946; Ranson, 1939) mientras que las lesiones de región preóptica generaban vigilia persistente (Nauta, 1946).

El comportamiento sexual también se relacionó con el hipotálamo ya que lesiones bilaterales de la región ventral del hipotálamo anterior entre el quiasma óptico y el tallo de la hipófisis resultaba en la eliminación del comportamiento sexual tanto en cobayos hembras como en machos (Brookhart, et al., 1940; Dey, et al., 1940). Si a estos animales se les estimulaba esta misma región mediante la administración de las hormonas sexuales apropiadas se generaba un comportamiento sexual que perduraba en el tiempo (Fisher, 1956).

En 1953 Olds y Milner trabajando en la Universidad de McGill, reportaban que la autoestimulación eléctrica leve en determinados sitios dentro del hipotálamo, o de su extensión rostral, el septum, provocaba en los animales de experimentación un comportamiento particular que podría definirse como un estado de recompensa. En sus trabajos demostraron que los animales eran capaces de renunciar al alimento y sortear varias dificultades con tal de poder presionar la palanca, cerrar el circuito, y entonces

recibir la descarga eléctrica que les generaba el mencionado estado de recompensa. Si el electrodo era colocado a una distancia de no más de un milímetro alejado del sitio en el que generaba placer, el resultado de la estimulación era la aversión. Luego de una única descarga los animales se alejaban de la palanca y demostraban renuencia a volver cerca de ella. Con estos trabajos quedaba demostrado que el hipotálamo no solamente se hallaba involucrado en las funciones endócrinas y viscerales sino que también jugaba un papel importante en las emociones y la motivación.

En 1960 John Flynn y sus colegas trabajando en Yale utilizaron la estimulación eléctrica del hipotálamo en gatos para estudiar las respuestas de ataque. El sujeto experimental, un gato, habíase acostumbrado a la presencia de una rata en su misma jaula, con la cual compartía no solo el espacio sino también el alimento. Cuando se estimulaba cierta región del hipotálamo se registraba una respuesta de ataque, compuesta en su mayoría por zarpazos y siseos sin llegar a morder a la rata, a menos que la estimulación fuera mantenida por un período prolongado. Cuando el electrodo de estimulación se cambiaba ligeramente de posición la respuesta era un ataque de tipo depredador, silencioso y efectivo, sin componente emocional aparente.

Con el advenimiento de técnicas más sofisticadas, como el desarrollo de la biología molecular, las técnicas de secuenciación y detección de proteínas, el clonado de genes, etc. se ha profundizado en el estudio de algunos de los comportamientos en los cuales el hipotálamo se halla involucrado. Se han realizado estudios anatómicos, neuroquímicos que sumados a los estudios electrofisiológicos supusieron un gran avance en la caracterización de diferentes regiones de esta estructura. Hay todavía un largo camino por recorrer en lo que respecta a la comprensión de la anatomía y fisiología de esta compleja estructura.

Este pequeño resumen acerca del hipotálamo es apenas un esbozo de la plétora de funciones en las que este se encuentra involucrado. Su papel central, su conexionado, su fisiología, son sólo algunas de las razones por las cuales esta pequeña estructura continúa alimentando la fascinación de los investigadores, quienes con esfuerzo se abocan a la ardua tarea de su estudio.

INTRODUCCIÓN

Los vertebrados superiores realizan, con el objeto de sobrevivir y reproducirse, una serie de complejos actos motores. Debido a que estos se hallan involucrados en los preceptos biológicos básicos, su correcto desarrollo debe ser asegurado. Por lo tanto, el sistema de control motor debe de ser extremadamente eficiente, integrando, procesando y respondiendo a los estímulos que recibe. Esto supone una estrecha relación entre muchas estructuras, desde la corteza cerebral hasta los músculos, que deben ser orquestadas adecuadamente. Con este fin, se establece un orden jerárquico en cuyo vértice se ubican los centros superiores de procesamiento, como las cortezas de asociación o la corteza motora, mientras que en su base se hallan los efectores. El hipotálamo, quien juega un papel en el desarrollo de comportamientos que incluyen actos motores, forma parte de esa jerarquía. Sin embargo, su papel en el control de los actos motores no se halla completamente establecido. En ese sentido, este trabajo aporta nueva evidencia que apunta a una mejor comprensión de esta función hipotalámica como vía motora paralela a las ya descritas.

El hipotálamo posee un extenso e intrincado conexionado, debido en parte a la variedad y el número de funciones en que se halla involucrado. Sus proyecciones lo relacionan con casi la totalidad de las estructuras que conforman el SNC, a las que debemos sumar las vastas interconexiones internas que presenta. La descripción detallada de la distribución de los núcleos dentro del hipotálamo así como de sus conexiones intrahipotalámicas y con otras estructuras, no resulta indispensable para el desarrollo del presente estudio. Por consiguiente, en la introducción se hará referencia estrictamente a lo necesario para la correcta realización del trabajo. Sin embargo, la anatomía del hipotálamo, conjuntamente con sus relaciones es un tema de exquisita belleza para quien desarrolló esta tesis y por lo tanto, en el Anexo I de este trabajo, el lector puede encontrar información más detallada acerca de este tema.

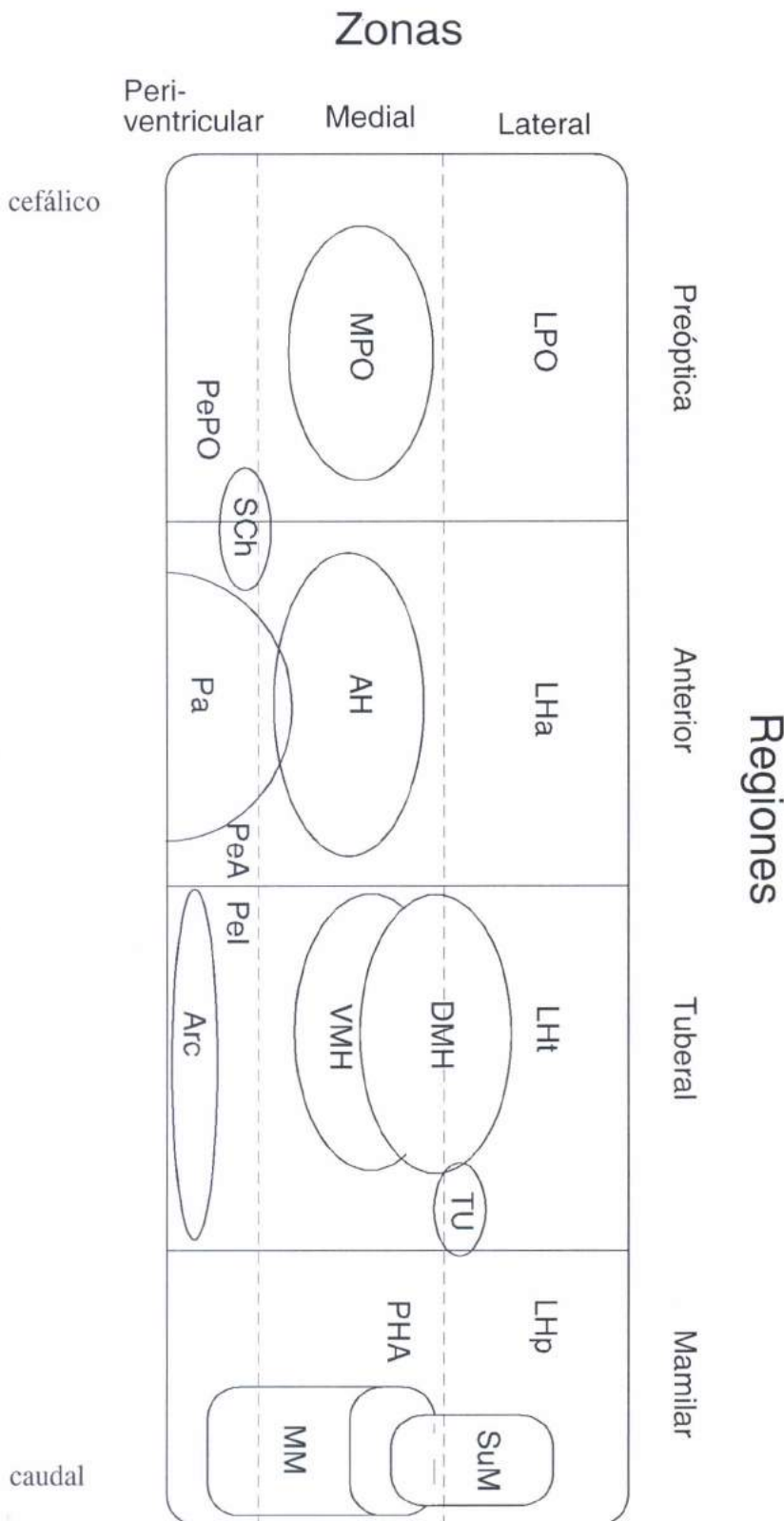
El hipotálamo

Ocupa el sector ventral del diencefalo, a ambos lados del tercer ventrículo e inmediatamente por encima de la glándula pituitaria. Sus límites son un tanto arbitrarios debido a que esta estructura se fusiona imperceptiblemente con las estructuras adyacentes (Mountcastle et al., 1986). El límite dorsal queda establecido por el surco hipotálamico en la pared medial del tercer ventrículo, aproximadamente en el plano horizontal de la comisura anterior. En este sector el hipotálamo se continúa con el subtálamo y la zona incerta. Lateralmente queda limitado por la cápsula interna y el pedúnculo cerebral. La región preóptica constituye la región más rostral del hipotálamo delimitado por la comisura anterior (dorsalmente) y por el núcleo de la banda diagonal de Broca. El extremo posterior forma un continuo con la sustancia gris periaqueductal y el área tegmental ventral, su límite posterior se establece por un plano imaginario definido ventralmente por los cuerpos mamilares y dorsalmente por la comisura posterior.

El hipotálamo esta constituido por una serie de núcleos que se distribuyen de manera particular dentro de esta estructura. Para realizar la sistematización de la ubicación anatómica de núcleos fue necesaria la parcelación del hipotálamo en sectores discretos. El esquema que se utilizará en el presente trabajo supone la existencia de doce subdivisiones conformadas a partir de la superposición de cuatro niveles o regiones en sentido rostrocaudal (a las que designó preóptica, supraóptica también llamada anterior, tuberal y mamilar) con tres divisiones o zonas longitudinales en sentido medial-lateral (a las que denominaron periventricular, medial y lateral, según su ubicación relativa al tercer ventrículo). El esquema de la Fig. 1, representa una ilustración de la disposición de las zonas y las regiones previamente descritas. Se pueden observar además algunos de los núcleos que conforman el hipotálamo y su distribución en las diferentes subdivisiones.

Con respecto a la composición neuroquímica del hipotálamo, solamente abordaremos la descripción detallada de dos sistemas neuropeptidérgicos; el sistema que utiliza la hormona concentradora de melanina (MCH) y el sistema que emplea hipocretina (Hcrt), por su relevancia para el desarrollo del presente estudio.

Figura 1. Diagrama de la división del hipotálamo en doce parcelas



En el esquema se detallan algunos de los núcleos que constituyen el hipotálamo. AH, núcleo hipotalámico anterior; Arc, núcleo arcuato; DMH, núcleo hipotalámico dorsomedial; LHa, área hipotalámica lateral anterior; LHp, área hipotalámica lateral mamilar; LHt, área hipotalámica lateral tuberal; LPO, área preóptica lateral; MM, núcleos mamilares; MPO, núcleo preóptico medial; PHA, área hipotalámica posterior; Pa, núcleo paraventricular; PeA, núcleo periventricular anterior; PeI, núcleo periventricular intermedio; PePO, núcleo preóptico periventricular; SCh, núcleo supraquiasmático; TU, núcleo tuberal; SuM, núcleo supramamilar; VMH, núcleo hipotalámico ventromedial.

Sistema MCHérgico

La MCH es un péptido de 19 aminoácidos, que originalmente fue aislado de la glándula pituitaria de los peces teleósteos, es generado a partir de la proteólisis selectiva de una preprohormona de 165 amino ácidos (Kawauchi et al., 1983, Rance et al., 1979). Para alcanzar sus efectos fisiológicos, este sistema de señalización cuenta con dos receptores distintos, ambos acoplados a proteína G y denominados receptor para MCH tipo 1 (MCHR1) y tipo 2 (MCHR2). El patrón de expresión de estos receptores varía según las especies. El MCHR1 es expresado en todos los mamíferos, mientras que el MCHR2 no es expresado en algunas especies como cobayos, ratas, hámster y conejos (Tan et al., 2002). La multifuncionalidad del sistema se basa en que los receptores son capaces de formar complejos con diferentes tipos de proteína G, por ejemplo el MCHR1 se acopla a las proteínas tipo G_i y G_q (Hawes et al., 2000).

Desde el punto de vista funcional, este péptido está relacionado con el mantenimiento de la homeostasis energética, regulando el gasto energético, la termogénesis y la saciedad (Shi, 2004). Se ha reportado que la administración crónica de MCH directamente en el cerebro provoca un aumento en la ingesta de alimentos (hiperfagia) con un concomitante aumento del peso corporal (Qu et al., 1996; Rossi et al., 1999). Asimismo, los ratones knockout para el MCH expresan un comportamiento hipofágico, un fenotipo físico delgado y un incremento en su actividad metabólica. Es interesante mencionar que los ratones knockout para el MCHR1 presentan hiperactividad motora con un aumento específico de los movimientos motores finos (Marsh et al., 2002).

Las neuronas MCHérgicas no pertenecen específicamente a ningún núcleo hipotalámico, sino que su distribución se extiende a través de gran parte del hipotálamo. Rostralmente se observan a partir del núcleo paraventricular, en donde ocupan en la mayoría de las especies una ubicación dorsomedial. A medida que nos dirigimos caudalmente, estas células adoptan una ubicación central y lateral (perifornicales), y finalmente ventromedial. En algunas especies como cobayos y monos, su extensión caudal se registra hasta la comisura supramamilar. Desde esta ubicación hipotalámica, las neuronas MCHérgicas envían densas proyecciones intrahipotalámicas (Bittencourt et al., 1992) como así también hacia muchas otras estructuras del SNC, desde la corteza hasta la

médula espinal (Nahon et al., 1989; Bittencourt et al., 1992). Sumado a esto, es necesario mencionar que al igual que otros sistemas peptidérgicos hipotalámicos, las neuronas MCHérgicas utilizan concomitantemente otro tipo de moléculas señalizadoras. Específicamente se ha descrito que algunas neuronas coexpresan el péptido denominado transcripto relacionado con la cocaína y la anfetamina (cocaine amphetamine related transcript, CART) (Broberger, 1999).

Sistema hipocretinérgico

Las hipocretinas u orexinas son neuropéptidos cuyas neuronas productoras se encuentran localizadas exclusivamente en el hipotálamo lateral (LH) (Date et al., 1999; Peyron et al., 1998). Estos neuropéptidos fueron reportados por dos grupos distintos al mismo tiempo, razón por la cual fueron bautizados como hipocretina por uno de los grupos y orexina por el otro. En este trabajo se utilizará solamente la denominación hipocretinas para referirse a ellos.

Presentan dos formas; la hipocretina A (HcrTA, también llamada 1) de 33 aminoácidos y la hipocretina B (HcrTB, también llamada 2) de 28 aminoácidos, productos del clivaje proteolítico de un único péptido denominado prehipocretina. Se han descrito hasta el momento dos subclases de receptores denominados receptor para hipocretina tipo 1 (HcrTR1) y tipo 2 (HcrTR2) (Sakurai et al., 1998). Ambos se acoplan a proteínas G, específicamente el HcrTR1 se une a la G_q , mientras el HcrTR2 lo hace a las $G_{i/o}$ y la G_q (Zhu et al., 2003). Estos dos receptores poseen una distribución marcadamente diferente, pero a la vez complementaria, encontrándose en muchas estructuras; desde el tronco encefálico hasta la corteza (Marcus et al., 2001).

Conjuntamente con la amplia distribución de los receptores hipocretinérgicos, las neuronas hipocretinérgicas desde su ubicación exclusivamente hipotalámica, envían extensas proyecciones hacia todo el SNC, concentrándose particularmente en el propio hipotálamo, la amígdala, el núcleo accumbens, el septum y en los centros monoaminérgicos como el locus coeruleus, los núcleos del rafe y el área tegmental ventral.

De forma análoga a lo que ocurre con el sistema MCHérgico, el sistema

Hcrtérgico también utiliza otras moléculas señalizadoras. En éste caso se ha reportado que una subpoblación de neuronas hipocretinérgicas coexpresan el péptido dinorfina (Chou et al., 2001), la enzima sintasa de óxido nítrico (Cheng et al., 2003) cuya actividad genera el gas NO, y además utilizan glutamato como neurotransmisor clásico (Abramson et al., 2001).

Las Hcrt fueron originalmente relacionadas con la alimentación, debido a que su administración dentro del sistema ventricular del cerebro, generaba potentes efectos orexigénicos (Sakurai et al., 1998). Este efecto quedó confirmado por estudios posteriores, en los cuales se registró un fenotipo marcadamente hipofágico en animales knockout para la preprohipocretina (Hara et al., 2001; Willie et al., 2001). En estos mismos animales, Chemelli et al., (1999) observaron un fenotipo conductual que se asemejaba al comportamiento narcoléptico. Estudios posteriores, en caninos y en humanos, confirmaron que una disrupción en el sistema de señalización Hcrtérgico, por ejemplo una deficiencia en la expresión en sus receptores o la pérdida de neuronas productoras de Hcrt, conducían a la aparición de la narcolepsia (Lin et al., 1999).

Con respecto a su relación con la actividad motora, estudios de activación neuronal mostraron que las neuronas hipocretinérgicas parecieran estar específicamente activadas durante los comportamientos que incluyen un componente motor (Tortero et al., 2003). Asimismo otros estudios han reportado que la administración intracerebroventricular de Hcrt provoca un aumento dramático en determinadas estereotipias motoras como el lavado de cara, el acicalamiento y el comportamiento de búsqueda (Ida et al., 1999).

Antecedentes particulares

Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó que las neuronas hipocretinérgicas inervan dos importantes núcleos motores, el trigémino (mV) y el hipogloso (mXII) (Fung et al., 2001). Este trabajo se realizó utilizando un marcador retrógrado (sub unidad B de la toxina colérica, CTb) en combinación con técnicas de inmunohistoquímica. Como resultado de estos estudios, quedó demostrada la existencia de neuronas hipocretinérgicas en el hipotálamo que proyectan directamente al núcleo

mXII. En general se considera que cualquier estructura que proyecte directamente hacia los núcleos motores es una estructura premotora. Este concepto puede hacerse extensivo a las neuronas individuales, razón por la cual utilizaremos esta definición para referirnos a todas aquellas neuronas que cumplan con esta característica.

A lo largo de esta introducción se puede apreciar que el hipotálamo es una estructura diencefálica muy compleja, que se halla involucrada en una variedad de funciones desde el control endócrino y autonómico hasta los comportamientos emocionales y motivacionales. Uno de los componentes esenciales de estos comportamientos son los actos motores, para los cuales es necesario integrar y coordinar diferentes grupos de motoneuronas, modulando su actividad a través de diferentes sistemas de neurotransmisores/neuromoduladores. A pesar de ello, el hipotálamo no ha sido previamente asociado con el control directo de las motoneuronas. En su lugar, se considera que esta estructura diencefálica ejerce su influencia sobre las motoneuronas a través de sus conexiones con el sistema límbico, así como otras regiones telencefálicas y estaciones de relevo premotoras ubicadas en el tronco encefálico y la médula espinal.

HIPÓTESIS

Como indicamos anteriormente, nuestro grupo ha demostrado la existencia de neuronas premotoras hipocretinérgicas que proyectan al hipogloso en gatos. Estos resultados fueron confirmados por otro grupo de investigación para el caso del núcleo motor del trigémino en la rata (Zhang y Luo, 2002). En este trabajo nos propusimos como hipótesis de trabajo determinar la existencia de otras neuronas premotoras en el hipotálamo, de composición neuroquímica diferente a la hipocretinérgica, que también proyectaran directamente a los núcleos motores. Esta idea surge a partir de la observación de fibras inmunoreactivas para el MCH atravesando los núcleos motores, que sumado a la presencia del RNA mensajero que codifica los receptores de dicho neuropéptido en las motoneuronas (Saito et al., 2001), hacen suponer que este sistema de señalización ejerce influencia sobre estas neuronas.

Como modelo de estudio se utilizó el núcleo motor del trigémino debido a que éste se encuentra involucrado en comportamientos en los cuales el hipotálamo juega un papel generador y/o modulador como por ejemplo la alimentación, la reproducción y la agresión.

OBJETIVO GENERAL

Investigar la existencia de neuronas premotoras hipotalámicas que presenten un fenotipo diferente al hipocretinérgico. De comprobar este hecho, determinar su localización hipotalámica, su distribución y su fenotipo de neurotransmisión.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar las neuronas premotoras que proyectan al núcleo motor del trigémino mediante la utilización del marcador retrógrado CTb, administrado directamente

en el núcleo motor.

- 2) Reconocer neuronas inmunopositivas para el marcador retrógrado.
- 3) Establecer la distribución, la morfología y los posibles fenotipos de las neuronas positivas para la CTb, entre ellos el glutamato, GABA, catecolaminas y óxido nítrico (NO).

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo con la reglamentación aprobada por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Para la realización del presente trabajo se utilizaron seis cobayos de un peso de entre 500 a 600 g, a los cuales se les inyectó CTb en el núcleo motor del trigémino. Los animales fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina, en donde fueron mantenidos en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas con comida y agua *ad libitum*.

Para la realización del procedimiento quirúrgico, cada animal fue premedicado con sulfato de atropina (0.1 mg/kg i.p.), y anestesiado con pentobarbital sódico (35 mg/kg i.p.). La cabeza del animal fue colocada en un marco estereotáxico y su cráneo óseo fue expuesto mediante una incisión en sentido anteroposterior. Se realizó un agujero rectangular en el cráneo en las siguientes coordenadas estereotáxicas: Anteroposterior (AP): +0.4 y Lateromedial (L): +2.2 según el atlas de Rapisarda y Bacchelli (1977) que corresponden a la ubicación del mV. Un segundo agujero fue realizado en el cráneo en las coordenadas estereotáxicas: AP: +13 y L: +2, con el objetivo de colocar un electrodo de plata que oficiara como indiferente. Este fue insertado entre las meninges y el cráneo, y fijado al mismo mediante cemento dental.

Luego de retiradas las meninges, se dirigió la punta de una micropipeta de vidrio (diámetro de punta 15-20 μm) con una solución de NaCl (0.5 M) hacia el núcleo motor del trigémino, con el objetivo de registrar el potencial de campo antidrómico. Este fue evocado mediante la estimulación eléctrica del músculo masetero ipsilateral, a través de un par de electrodos de metal (para más detalle acerca del sistema de estimulación y registro ver Castillo et al., 1991). Una vez localizado el núcleo motor del trigémino, se procedió a la determinación de su extensión anteroposterior, lateromedial y dorsoventral. Para ello se realizó una serie de registros del potencial de campo evocado en diferentes coordenadas estereotáxicas utilizando siempre una misma intensidad de estimulación. Para cada animal se obtuvieron 36 valores distribuidos en los tres ejes cartesianos según detalle: 3 puntos lateromediales; 4 puntos anteroposteriores; 3 puntos dorsoventrales. Con estos valores se trazó un esquema tridimensional de la extensión del núcleo. Basados en

este esquema se fijaron las coordenadas estereotáxicas correspondientes a su centro y se sustituyó la micropipeta por otra de similares características (diámetro de punta 15-20 μm) que contenía una solución de CTb al 1.5% disuelta en buffer fosfato (PB) 0.1M a pH 6. Una vez posicionada la nueva pipeta en el sitio seleccionado, se procedió a registrar nuevamente el potencial de campo evocado para descartar posibles errores durante el procedimiento de cambio. En todos los casos se realizaron varios registros con esta pipeta, y donde el potencial de campo tuvo un valor máximo (4 milivolts) la CTb fue inyectada iontoforéticamente. Los parámetros utilizados para la inyección fueron: corriente positiva de 2 μA en pulsos de 7 s (7 s pasaje de corriente, seguidos por 7 s de no pasaje) por un intervalo de 30 minutos.

Luego de finalizado el tiempo de inyección, la micropipeta fue mantenida en posición por 20 minutos adicionales para contrarrestar el derrame del marcador durante el procedimiento de remoción de la misma.

Una vez retirada la micropipeta, se suturó la herida, se administró suero por vía subcutánea (10 ml) y se mantuvo al animal a temperatura controlada (36 °C) hasta que se recuperó completamente de la anestesia. Luego, el animal fue devuelto al bioterio donde fue colocado en un área especializada para su control periódico.

Preparación del material para el estudio morfológico

Para localizar y determinar el fenotipo de las células premotoras en el hipotálamo, la arquitectura del tejido y sus componentes moleculares deben mantenerse intactos o conservarse lo mejor posible. Para lograr una buena preservación del tejido, éste debe fijarse adecuadamente, y protegerse del daño osmótico. En este trabajo se utilizó el fijador propuesto por Luppi (Luppi et al., 1990), ya que era adecuado para los análisis subsecuentes que se realizarían sobre los tejidos.

Catorce días después de la intervención quirúrgica, tiempo éste necesario para permitir el transporte axoplásmico de la CTb desde los terminales hacia el soma, los animales fueron profundamente anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg), y perfundidos transcardíacamente con 0.5l de solución fisiológica heparinizada (1000

unidades/l) seguida de 1l de una solución de 4% paraformaldehído, 15% ácido pícrico saturado y 0.25% glutaraldehído en PB 0.1M a pH 7.4.

El cerebro y el tronco encefálico fueron extraídos de su cubierta osteofibrosa y todo resto de meninges fue cuidadosamente retirado. Inmediatamente fueron colocados durante 24 horas en una solución de 2% paraformaldehído, 15% ácido pícrico saturado y 20% sucrosa en PB 0.1 M a pH 7.4, para realizar el proceso de post-fijación. Transcurrido este período los tejidos fueron crioprotectados mediante su inmersión por 48 horas en una solución de 30% sucrosa en PB 0.1M a pH 7.4.

Las piezas fueron luego congeladas, para lo cual fueron colocadas en un molde diseñado especialmente, y cubiertas con una matriz líquida (Tissue- Tek®, Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japón) que a temperaturas inferiores a 0 °C solidifica. Estos moldes fueron colocados en una cámara de congelación conjuntamente con dióxido de carbono sólido. Posteriormente los bloques fueron cortados en secciones con un grosor de 30 µm en un crióstato Leica CM 1900 (Nussloch, Alemania). Cada sección fue colocada en un recipiente de doce dispuestos en una cubeta rectangular con buffer fosfato de sodio (PBS) 0.1M a pH 7.4. La sección número uno fue colocada en el recipiente número uno; las secciones consecutivas fueron colocadas en los restantes recipientes siguiendo un orden secuencial. La sección número trece fue colocada en el recipiente número uno y se repitió este procedimiento hasta que toda la pieza fue seccionada. En cada uno de los recipientes se encuentra una muestra representativa de toda la estructura, y las secciones consecutivas en cada recipiente se encuentran separadas por una distancia de 360 µm. El tejido fue lavado dos veces (5 minutos cada vez) con una solución de PBS 0.1M y luego almacenado en recipientes de vidrio con PBS 0.1M con 0.1% de azida de sodio y mantenido a 4 °C hasta su utilización. El tronco y el cerebro fueron cortados en el plano coronal.

Métodos de inmunohistoquímica e histoenzimología.

Todos los procedimientos inmunohistoquímicos fueron realizados con la técnica de incubación secuencial de cortes libres en flotación. Entre cada incubación se

realizaron tres lavados de 10 minutos de duración cada uno en PBS con 0.3% de Triton X-100 (PBST), a menos que se indique lo contrario.

La detección de la CTb transportada retrógradamente fue realizada mediante una técnica inmunohistoquímica indirecta utilizando el complejo avidina-biotina. Primero se incubaron las secciones durante 18 horas con un anticuerpo policlonal anti-CTb generado en cabra (anticuerpo primario, goat anti-CTb, List Biological Laboratories, Campbell, CA) dilución 1:20000 en PBST. Luego se incubaron durante 90 minutos en una solución con un anticuerpo policlonal biotinilado anti inmunoglobulinas (IgG) de cabra generado en burro (anticuerpo secundario, biotinylated donkey anti-goat serum, DAG, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) dilución 1:2000 en PBST. Seguidamente se incubó durante una hora en el complejo avidina-biotina (ABC), (ABC-Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) dilución 1:400 en PBST el que se une al anticuerpo secundario biotinilado, amplificando la señal. Finalmente, la peroxidasa se revela utilizando diaminobencidina tetrahidroclorada (DAB) al 0.02% con 0.03% de peróxido de hidrógeno en 50 ml de buffer TRIS-HCl 50 mM a pH 7.5 por 8-10 minutos. Esta amina es rápidamente oxidada por la enzima en presencia de peróxido de hidrógeno dando un polímero insoluble color pardo que puede ser visualizado al microscopio óptico (Fig. 4 C).

Para todos los procedimientos de doble inmunohistoquímica, en los cuales se utilizó la DAB como método de revelado, fue necesario diferenciar los productos de su reacción. Para ello se agregó sulfato de níquel al 0,6% al producto de una de las dos reacciones. Esto genera un precipitado más oscuro y diferenciable del precipitado generado por la DAB en ausencia del metal (Fig. 4 D).

En todos los procedimientos de doble tinción realizados, a menos que se indique lo contrario, los tejidos fueron procesados primero para la detección de la CTb y luego para los demás neurotransmisores. Para el caso particular de la detección de la actividad de la enzima diaforasa dependiente de NADPH (NADPH-d) mediante la utilización de una sal de tertrazolio (nitro blue tetrazolium, NBT), este procedimiento fue realizado previamente a la detección de la CTb (ver más abajo).

Para la detección del glutamato, las secciones fueron procesadas en primer lugar para la detección de la CTb utilizando el método de la DAB con agregado de 0.6% de

sulfato de níquel. Luego, las secciones fueron preincubadas en 6% de suero normal de burro (normal donkey serum, NDS) en PBST. Este procedimiento se realiza para evitar uniones inespecíficas de anticuerpos que generan tinción de fondo o marca inespecífica. Se prosiguió a la incubación de los tejidos en el anticuerpo primario monoclonal anti glutamato (mouse anti-glutamate antibody, Swant, Bellinzona, Switzerland) 1:1500, 3% NDS en PBST. Luego, fueron incubadas en un anticuerpo secundario para reconocer al primario (donkey anti-mouse serum, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) 1:200, 3% NDS. Seguidamente las secciones fueron incubadas en ABC estándar (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 1:200 y finalmente procesadas con el método de DAB.

Alternativamente a la utilización de los dos productos de la DAB (precipitado marrón y precipitado negro) como método de detección, para la realización de los procedimientos de doble tinción se utilizó una combinación de un producto de la reacción de la DAB (precipitado marrón) con uno de inmunofluorescencia. También se utilizó una combinación de dos técnicas de inmunofluorescencia para realizar el doble marcado, para lo cual se seleccionaron anticuerpos secundarios conjugados con dos fluoróforos cuyos rangos de excitación-emisión permitiera diferenciarlos.

Uno de los ingredientes que contiene la solución utilizada para la perfusión de los animales es el glutaraldehído. Esta molécula, en combinación con las proteínas presentes en el tejido animal introduce, de manera artificial, un considerable número de grupos aldehídos que autofluorescen cuando son excitados con un determinado rango de longitudes de onda. Dentro de este rango, se encontraban las longitudes de onda que se utilizarían en el análisis de la inmunofluorescencia, por lo que fue necesario recurrir al bloqueo de estas señales artefactuales para evitar la posible obtención de falsos positivos. Para ello, las secciones fueron incubadas en una solución con boridruro de sodio (NaBH_4) al 0.5%, un agente que reduce los grupos aldehídos, previo a la realización de la técnica inmunohistoquímica en la que se utilizará como método de visualización la fluorescencia. En combinación de éste compuesto se utilizó glicina en una concentración final de 50mM y albúmina obtenida de suero bovino (bovine serum albumina, BSA) al 0.1% con el mismo objetivo.

Como ya mencionamos, la hipocretina presenta dos formas, HcrtA e HcrtB (Sakurai et al., 1998). Debido a que ambas formas (Zhang et al., 2002) colocalizan en las mismas neuronas, para el presente trabajo se utilizó un anticuerpo que reconoce la HcrtB.

Luego de procesadas para la detección de la CTb las secciones fueron incubadas primero en una solución de 50 mM de glicina en PBS con 0.1% de BSA y subsecuentemente en 5% NDS, 2% BSA en PBST. Las secciones fueron luego incubadas con un anticuerpo primario anti-HcrtB generado en conejo (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA), dilución 1:15000 en PBS con 3% NDS. Seguidamente, los tejidos fueron incubados en un anticuerpo secundario generado en burro anti-IgG de conejo conjugado con un fluoróforo, Alexa Fluor 594 (Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), dilución 1:500. Alternativamente se realizó la doble inmunohistoquímica utilizando los dos productos de la reacción de la DAB. Para ello se procesaron los tejidos en primer término para la detección de la CTb con el agregado de níquel luego de lo cual fueron incubados en el mismo anticuerpo a la misma dilución utilizado en el primer ensayo para la detección de la HcrtB. Seguidamente se colocaron en el anticuerpo secundario generado en burro anti-conejo conjugado con avidina (donkey anti-rabbit IgG), dilución 1:300 con 3% NDS en PBST. Finalmente fueron expuestos al complejo ABC, dilución 1:200 y procesados con el método de la DAB.

Para detectar la presencia de la MCH en las neuronas premotoras, las secciones fueron incubadas simultáneamente en un anticuerpo primario anti-MCH generado en conejo (rabbit anti-MCH antibody, Phoenix Pharmaceuticals), dilución 1:2000 y en un anticuerpo primario anti-CTb generado en cabra (goat anti-CTb antibody List Biological Laboratories), dilución 1:6000 con 6% NDS. Luego fueron incubados en anticuerpos secundarios conjugados cada uno con un fluoróforo diferente. En éste caso se utilizaron anti-IgG de conejo generado en burro Alexa Fluor 594 (Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG, Molecular Probes), dilución 1:200 y anti-IgG de cabra generado en burro (Cy2 donkey anti-goat IgG, Jackson Immunoresearch) dilución 1:200, para detectar la inmunofluorescencia generada por la presencia de MCH o CTb respectivamente.

Alternativamente al igual que para la detección de HcrtB, se realizó una doble inmunohistoquímica utilizando los dos productos de la reacción de la DAB. Para ello se

procesaron los tejidos en primer término para la detección de la CTb con el agregado de níquel, luego de lo cual fueron incubados de manera secuencial en anticuerpo primario anti-MCH generado en conejo (rabbit anti-MCH antibody, Phoenix Pharmaceuticals), dilución 1:30000 en PBST con 2% de BSA; anticuerpo secundario anti-IgG de conejo generado en burro, dilución 1:1000 con 2% BSA en PBST; ABC dilución 1:400. Finalmente las secciones fueron procesadas con el método de la DAB.

Para detectar la isoforma neuronal de la enzima sintasa de óxido nítrico (nNOS) se utilizaron dos técnicas. Primeramente se llevó a cabo una técnica enzimológica que consiste en demostrar la actividad NADPH-d que posee la nNOS. Esta actividad se conserva aún luego de la fijación con aldehídos (Nakos y Gossrau, 1994). El método consiste en incubar las secciones flotantes con NBT al 0,01% en PBST como sustrato de la enzima, y β -NADPH al 0,1% como dador de electrones para la reacción. La incubación se realiza durante 30-60 minutos a 37 °C, hasta que se detecta un precipitado azul (formazán) visible al microscopio óptico.

La correlación entre la ubicación de los productos de la reacción enzimática de la NADPH-d y la detección inmunohistoquímica de la nNOS ha sido previamente descrita (Hope et al., 1991). Debido a la colocalización de ambos productos la actividad NADPH-d es utilizada como un marcador específico de la presencia de nNOS y es ampliamente utilizada para estudiar la distribución de las neuronas y fibras nitrérgicas (Dawson et al., 1991).

La segunda técnica utilizada para la ubicación de las neuronas nitrérgicas premotoras fue la detección inmunohistoquímica de la enzima nNOS. Para ello las secciones se incubaron en una solución con borhidruro de sodio al 0.5%. Luego fueron procesadas para la detección de la CTb, y a continuación fueron incubadas en una solución de 50 mM glicina con 0.1% BSA en PBS, seguida de una solución con 6% NDS, 2% BSA en PBST. Seguidamente fueron incubadas en el anticuerpo policlonal anti-nNOS de rata generado en conejo (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) dilución 1:1000 y luego expuestas al anticuerpo secundario anti-IgG de conejo generado en burro Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) dilución 1:500 con 2% BSA y 6% NDS para la detección por fluorescencia de la nNOS.

Nº 11814



Para identificar posibles neuronas premotoras colinérgicas, se optó por la detección de la enzima acetilcolina transferasa (ChAT) cuya función es la de catalizar la transferencia de un grupo acetilo a una colina generando el neurotransmisor acetilcolina.

El procesamiento para la CTb fue realizado con el agregado del metal, luego de lo cual las secciones fueron incubadas con un anticuerpo policlonal contra la enzima ChAT de placenta humana generado en cabra (Chemicon International, Temecula, CA, USA) dilución 1:200 en PBST. Seguidamente fueron incubadas en un anticuerpo policlonal biotinilado generado en burro anti- IgG de cabra (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) dilución 1:100 en PBST y procesadas con el kit ABC 1:200. Subsecuentemente el tejido fue tratado con el método de la DAB.

La identificación de posibles neuronas catecolaminérgicas premotoras fue realizado con la detección de la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Esta enzima se halla involucrada en la conversión de la L-tirosina en 3.4-dihidroxifenilalanina (DOPA) primer paso y reacción limitante en la síntesis de las catecolaminas.

Las secciones fueron incubadas en PBS con 50 mM de glicina y 0.1% de BSA seguido del procesamiento para la detección de la CTb. Luego, las secciones fueron incubadas en un anticuerpo anti-TH generado en oveja (Pell-Freez, Rogers, AR, USA) dilución 1:5000. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-IgG de oveja generado en burro y conjugado con un fluoróforo, Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) dilución 1:1000.

Para determinar posibles aferencias gabaérgicas desde el hipotálamo hacia éste núcleo motor, se procedió a identificar las neuronas gabaérgicas mediante la detección de la enzima glutamato decarboxilasa (GAD) que cataliza la conversión de glutamato en GABA. Existen por lo menos dos isoformas de ésta enzima denominadas GAD 67 y GAD 65. La diferencia estriba en el peso molecular de cada una que es 67 KDa y 65 KDa respectivamente. Asimismo la localización celular de ambas isoformas es distinta, mientras que la GAD 65 se encuentra asociada a las vesículas sinápticas, la GAD 67 se halla en el citosol (Martin y Tobin, 2000). Por esta razón la GAD 67 es la indicada para reconocer somas neuronales y la GAD 65 para reconocer terminales. Actuando en consecuencia, los ensayos inmunohistoquímicos fueron realizados utilizando un anticuerpo que reconociera la isoforma GAD 67.

Las secciones fueron primeramente incubadas en boridruro de sodio al 0.5% y procesadas para la detección de la CTb. Seguidamente fueron incubadas en PBS con 50 mM glicina y 0.1% BSA, luego en PBST con 6% BSA y finalmente expuestas al anticuerpo anti-GAD67 generado en ratón (Chemicon International, Temecula, CA, USA) dilución 1:1000 en PBST con 4% BSA. Luego fueron incubadas en el anticuerpo Alexa Fluor 555 anti-IgG de ratón generado en burro (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) dilución 1:500.

Con el objetivo de identificar y determinar el tamaño del cuerpo de las neuronas que no contenían CTb se realizó el procedimiento para la detección de la CTb seguido de una contratinción utilizando pironina-y. Este compuesto es una xantina catiónica planar que probablemente se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos (Kiernan, 1999). Esta xantina se visualiza como una coloración rosada cuando se observa con un microscopio de campo claro.

Una vez que las secciones fueron procesadas para la CTb y montadas en los correspondientes porta objetos, se realizó esta técnica, para lo cual se utilizó una solución de pironina-y conjuntamente con una solución de buffer acetato al 0.05% a pH 6.

Para confirmar la especificidad de los anticuerpos utilizados se realizaron ensayos de preadsorción y de omisión para la HcrtB, la MCH y la nNOS mientras que sólo ensayos de omisión fueron realizados para la GAD67, la TH y la ChAT. No se halló inmunoreactividad en ninguno de los casos.

Análisis

Los preparados histológicos fueron examinados utilizando un microscopio óptico Olympus BH2. Las secciones procesadas para la detección de CTb utilizando el método de la DAB fueron analizadas con la ayuda de un microscopio montado con una cámara lúcida. Las neuronas CTb⁺ fueron contadas y sus diámetros mayor y menor medidos y promediados. También se procedió a la determinación de los diámetros mayor y menor de los cuerpos neuronales teñidos solamente con pironina-y, como técnica de Nissl.

Para el análisis de la inmunofluorescencia, se utilizó un microscopio con epifluorescencia Nikon Eclipse E 600FN, equipado con la correcta combinación de filtros

que resulta adecuada para la detección de cada uno de los fluoróforos conjugados con los anticuerpos y utilizados para las reacciones de inmunodetección. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital SPOT RT v3.4 (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA). La compaginación de las imágenes así como la determinación de la colocalización de las señales fue realizada con Adobe Photoshop® (Adobe Systems, Inc).

Para estimar el número de neuronas marcadas retrógradamente se utilizó el método del disector estereológico como fue descrito por Coggeshall (1992) y por Coggeshall y Lekan (1996) (ver también Saper 1996). Este método requiere una estimación del volumen ocupado por las regiones que están siendo estudiadas al que se denomina volumen de referencia (V_{ref}) y una estimación de la densidad (N_d), en éste caso de las neuronas CTb^+ en las secciones histológicas. Luego el producto de la multiplicación [$V_{ref} \times (N_d)$] nos da el número estimado de neuronas CTb^+ . Este mismo procedimiento se realizó para estimar el número de neuronas doblemente marcadas.

RESULTADOS

La localización del núcleo motor del trigémino dentro del tronco encefálico fue realizada mediante la utilización de criterios electrofisiológicos. Específicamente se registró el potencial de campo antidrómico del mV, evocado por la estimulación eléctrica del músculo masetero ipsilateral. La Fig. 2 muestra un registro de este potencial efectuado en las cercanías del centro estereotáxico, que previamente había sido determinado a partir de los esquemas tridimensionales realizados. Su amplitud (4 milivolts) representa el máximo valor registrado para el potencial de campo en las condiciones experimentales utilizadas y por lo tanto fue elegido como sitio de inyección para cada uno de los animales.

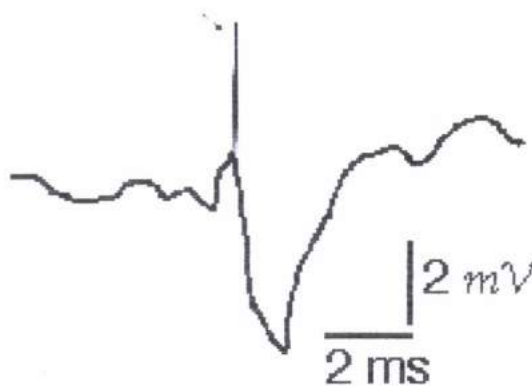
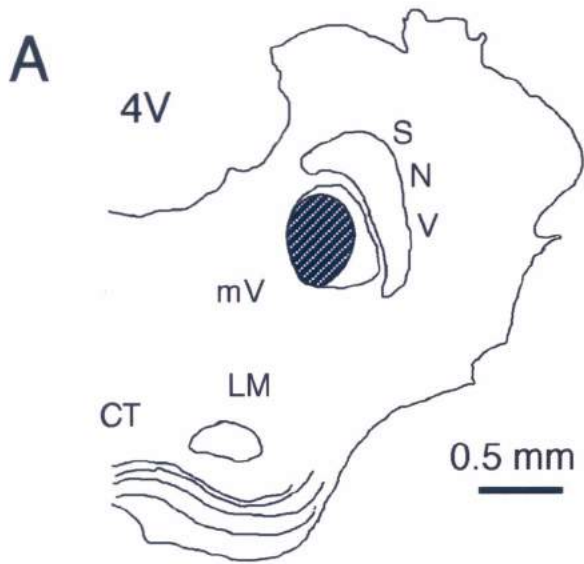


Fig. 2. El diagrama muestra un ejemplo de un potencial de campo antidrómico registrado en el núcleo motor del trigémino evocado por estimulación eléctrica del músculo masetero ipsilateral. La flecha indica el artefacto del estímulo y el trazado representa un barrido único.

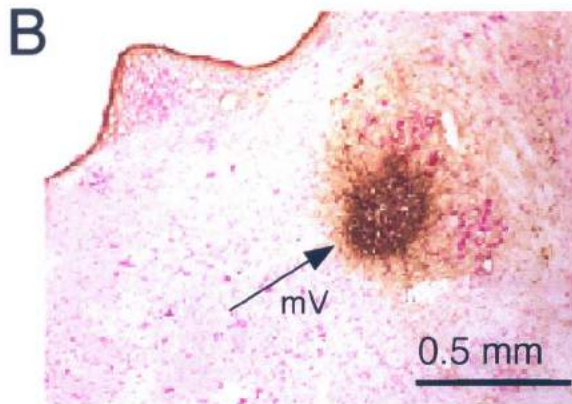
Luego de procesado el tejido, se procedió como primer paso al análisis del depósito de CTb en el mV de cada uno de los animales. La Fig. 3A muestra un dibujo representativo del sitio y del tamaño del depósito del marcador retrógrado. En la misma figura (Fig. 3B) se muestra también una microfotografía de ese mismo sitio. Como puede observarse, el depósito de CTb está constituido por una zona particularmente oscura rodeada por un halo de coloración más débil debido probablemente a la difusión extracelular del marcador, aunque dentro de los límites del mV.

Para el estudio de la localización de las neuronas premotoras se utilizaron cuatro animales en los cuales el depósito de CTb quedó exclusivamente circunscrito al mV. En

Figura 3. Localización del sitio de inyección en el mV



A.- Diagrama de una sección coronal del puente a la altura del trigémino. El área negra representa el sitio del depósito de la CTb. mV, núcleo motor del trigémino; CT, corpus trapezoideum; LM, lemniscus medialis; SNV, núcleo sensorial del nervio trigémino; 4V, cuarto ventrículo



B.- Microfotografía del depósito de CTb. La flecha apunta hacia el núcleo motor del trigémino.

otros dos animales el depósito quedó fuera del mV y por lo tanto no fueron utilizados para el presente estudio.

Para determinar el número, tamaño y distribución de las neuronas premotoras se realizaron dibujos de todas las secciones utilizando un microscopio equipado con una cámara lúcida. Se determinó la presencia de neuronas marcadas retrógradamente en diferentes sectores del hipotálamo. Un análisis más exhaustivo reveló la presencia de otras dos importantes poblaciones de neuronas CTb⁺. Una de ellas se encontró distribuida en el núcleo central de la amígdala (CeA), mientras que la segunda se observó en la sustancia nigra pars reticulada (SNpr). En el presente capítulo se describirá únicamente las poblaciones de neuronas premotoras distribuidas en el hipotálamo, mientras que la descripción de los resultados complementarios de las neuronas premotoras halladas en el CeA y en la SNpr, serán descritos en el anexo II del presente trabajo.

Neuronas premotoras hipotalámicas

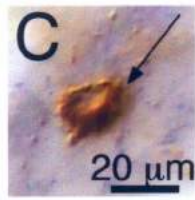
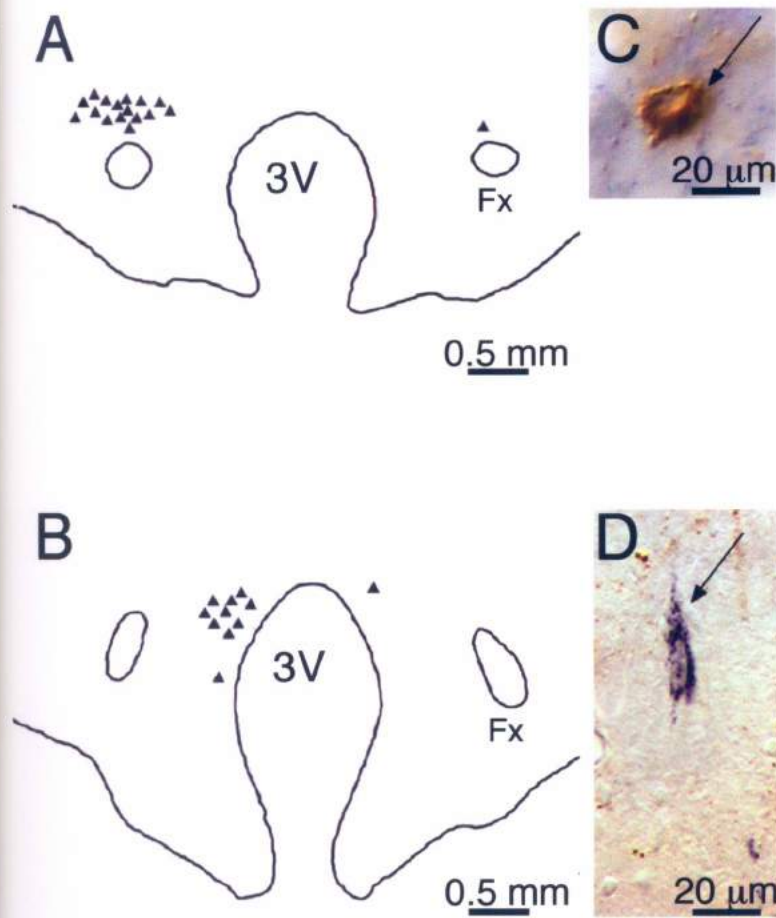
Las neuronas premotoras (CTb⁺) se hallaron localizadas en la región tuberal del hipotálamo, comprendida entre las coordenadas estereotáxicas; AP: +8 y AP +10.4 según el atlas de Rapisarda y Bacchelli (1977). Los diagramas de la Fig. 4 A y B fueron obtenidos de dibujos realizados con cámara lúcida de la región tuberal del hipotálamo; los triángulos negros representan neuronas premotoras.

En la Fig. 4 (C y D) también se muestran ejemplos de neuronas marcadas retrógradamente. Las neuronas CTb⁺ exhibieron un precipitado granuloso color marrón, característico de un producto de reacción de la DAB (Fig. 4C). Cuando se utilizó el agregado del metal níquel a la reacción, los gránulos citoplasmáticos adquirieron una coloración negra (Fig. 4D).

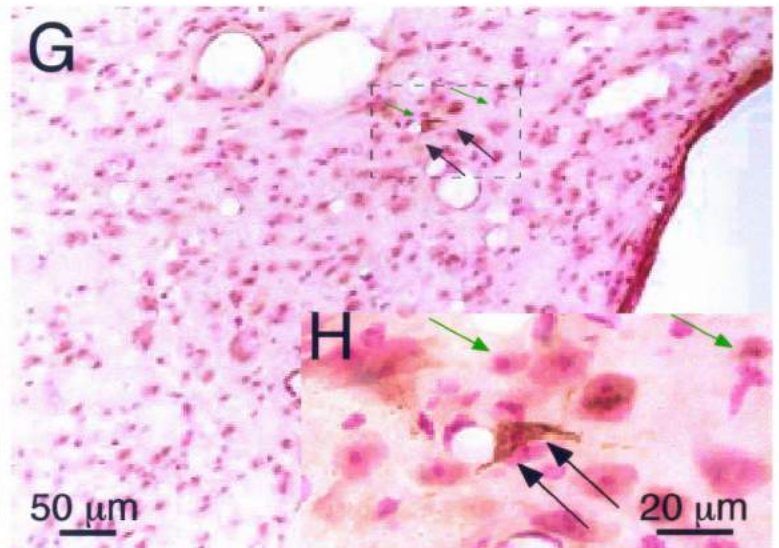
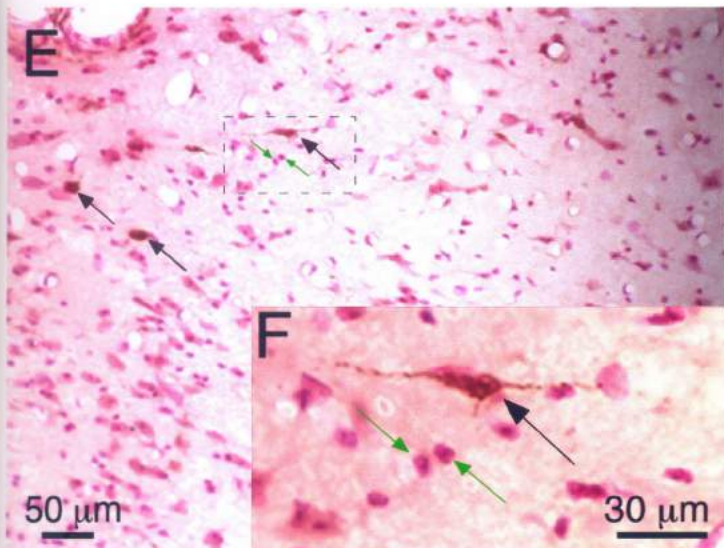
Neuronas inmunopositivas para la CTb

Una media de 448.8 ± 48.6 (EEM en esta y en todos los demás números de neuronas) neuronas CTb⁺ se hallaron localizadas ipsilateralmente, mientras que 83.9 ± 13.9 CTb⁺ fueron localizadas contralateralmente al sitio de inyección. En la tabla 1 se

Figura 4. Distribución de células CTb⁺ en el hipotálamo.



A y B. - Diagramas de dos secciones en el plano coronal del hipotálamo a nivel de la región tuberal. A.- Distribución de neuronas CTb⁺ (*triángulos negros*) de la primera población descrita, localizadas a través del LH, PEF y DMH. B.- Distribución de las neuronas CTb⁺ que pertenecen a la segunda población descrita, las que se dispusieron en el sector periventricular del DMH. C.- Microfotografía de una neurona (flecha negra) cargada con una gran cantidad de CTb localizada en el sector periventricular del DMH. En su citoplasma se pueden observar los típicos gránulos marrones, producto de reacción del revelado con el método de la DAB. D.- La microfotografía muestra un ejemplo de una neurona premotora CTb⁺ ubicada en el LH procesada con el método de la DAB con el agregado de sulfato de níquel (flecha negra). En este caso los gránulos adquirieron una coloración negra. Fx, fornix; 3V tercer ventrículo. E y G.- Ejemplos de neuronas premotoras y neuronas no premotoras. Las microfotografías muestran secciones del LH y del sector periventricular del DMH procesadas con el método de la DAB y contrateñidas con Pironina-Y. Las flechas negras indican las neuronas CTb⁺ mientras que las flechas verdes apuntan a neuronas de pequeño tamaño inmunonegativas para la CTb. Los montajes F y H son microfotografías a mayor aumento de las áreas delimitadas por los rectángulos en E y G.



resumen los resultados obtenidos para todos los animales. Las neuronas marcadas retrógradamente se distribuyeron en el núcleo dorsomedial (DMH), el núcleo perifornical (PEF) y la región tuberal del hipotálamo lateral (LHt). Según su ubicación se reconocieron dos poblaciones neuronales diferentes.

Tabla 1

Fenotipo Neuronal	Neuronas Hipotalámicas Premotoras del Trigémino	
	Ipsilateral	Contralateral
CTb ⁺	448 ± 48.6	83.9 ± 13.9
Glutamato ⁺ /CTb ⁺	68.9 ± 22.5	30.5 ± 5.2
Hert ⁺ /CTb ⁺	18.6 ± 2.8	18.7 ± 1.2
NADPH-d ⁺ /CTb ⁺	14.1 ± 3.1	XXX
MCH ⁺ /CTb ⁺	13.4 ± 2.8	14.6 ± 3.2

La tabla resume el número de neuronas hipotalámicas premotoras al núcleo motor del trigémino clasificadas según su fenotipo de neurotransmisor y distribución (cada número representa en cada categoría el número de neuronas promedio ± EEM).

En la primer población la distribución de las neuronas se registró a través del PEF, el LHt y la zona lateral del DMH como se muestra en la Fig. 4A. La región ocupada por estas células en el plano coronal, puede asemejarse a la superficie de una elipse con su eje mayor dispuesto en la dirección mediolateral. Las coordenadas esterotómicas de esta región son las siguientes; AP: +8 a +9, L: +0.75 a +2.5 y dorsoventral (H): +9.5 a +11 según el atlas de Rapisarda y Bacchelli (1977). Dentro de éste grupo se hallaron mayoritariamente neuronas con formas multipolar y fusiforme, con un diámetro mayor promedio de $30.0 \pm 8 \mu\text{m}$ y un diámetro menor promedio de $9.5 \pm 2.5 \mu\text{m}$. Se estimó para esta población un número total de células marcadas retrógradamente de 226.9 ± 50.9 ipsilaterales y 53.7 ± 9 contralaterales al sitio de inyección.

La segunda población de neuronas se halló localizada en la región periventricular del DMH como muestra la Fig. 4B. En el plano coronal este grupo neuronal ocupó una región de forma circular y su distribución abarcó las siguientes coordenadas estereotómicas; AP: +9 a +10, L: +0 a +0.5 y H: +9 a +9.5. Las células marcadas retrógradamente exhibieron un perfil oval con un diámetro mayor promedio de $18.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$ y un diámetro menor promedio de $10.6 \pm 3.5 \mu\text{m}$. El número total de células

marcadas retrógradamente para esta población, se estimó en 221.9 ± 45.9 ipsilaterales y 30.2 ± 5.3 contralaterales al sitio de inyección.

En ambas regiones se hallaron pequeñas neuronas entremezcladas con las neuronas CTb⁺ (Fig. 4E y G). No obstante, estas neuronas no fueron inmunopositivas para la CTb como se muestra en la fotomicrografía en la Fig. 4F y 4H (flechas verdes). Estas células presentaron forma oval con un diámetro mayor promedio de $8 \pm 2.5 \mu\text{m}$ y un diámetro menor promedio de $5.6 \pm 1.8 \mu\text{m}$.

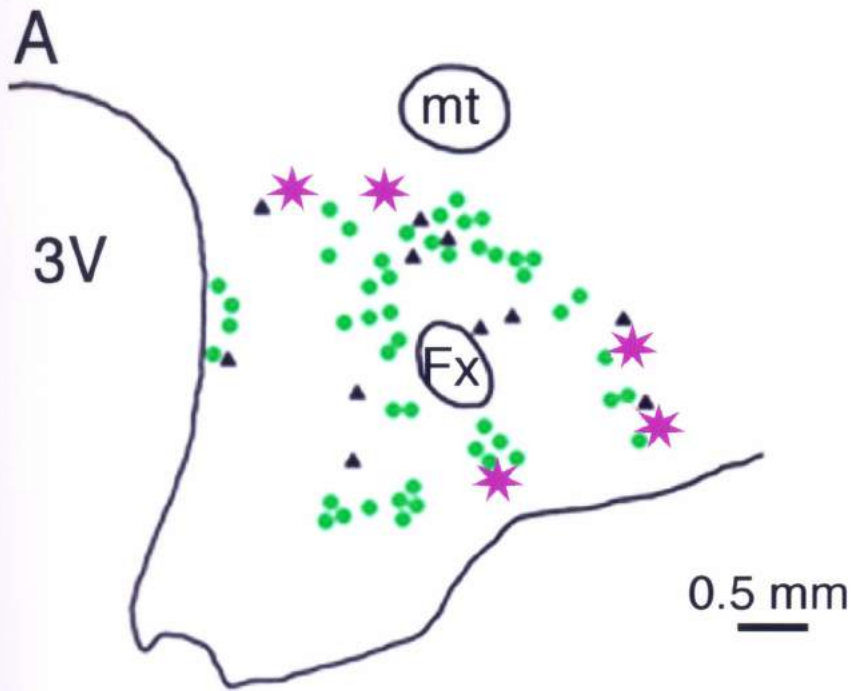
Neuronas premotoras glutamatérgicas

Una media de 99.4 ± 19.9 neuronas CTb⁺ exhibieron inmunoreactividad para el glutamato (Glut) (68.9 ± 22.5 ipsilaterales y 30.5 ± 5.2 contralaterales). Este número corresponde aproximadamente a 19% del total de neuronas marcadas retrógradamente. Su distribución incluyó el DMH, el LHt y el PEF y se encontraron presentes en las dos poblaciones neuronales previamente descritas. Un ejemplo de esta distribución se encuentra ilustrado en el diagrama de la Fig. 5A, en el cual las estrellas violetas representan las neuronas CTb⁺/Glut⁺, los triángulos negros, neuronas CTb⁺ y los círculos verdes, neuronas solamente glutamatérgicas. En la Fig. 5B, las flechas dobles apuntan a una neurona premotora glutamatérgica en la cual se aprecia el citoplasma marrón correspondiente a la inmunoreactividad al glutamato y un precipitado negro indicando la presencia de CTb transportada retrógradamente. En la misma fotomicrografía se puede observar una neurona exclusivamente inmunoreactiva al glutamato (Fig. 5B, cabeza de flecha.)

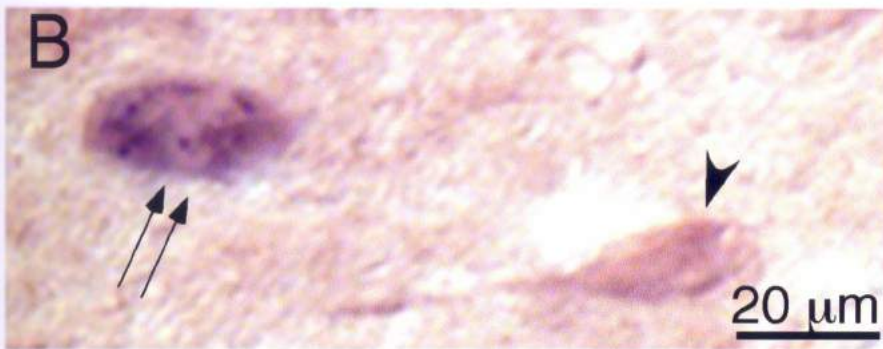
Neuronas premotoras nitrérgicas

Una población diferente, compuesta por 14.1 ± 3.1 neuronas que representan aproximadamente el 3% del total de neuronas CTb⁺ mostró doble marcaje para CTb⁺/NADPH-d⁺ o CTb⁺/nNOS⁺. Estas se encontraron exclusivamente del lado ipsilateral en la región periventricular del núcleo DMH. La Fig. 6A consiste en un diagrama que ejemplifica la distribución de las neuronas premotoras nitrérgicas

Figura 5. Neuronas glutamatérgicas en el hipotálamo



A.- Diagrama de una sección coronal del hipotálamo procesada para glutamato y CTb. Las *estrellas violetas* representan las neuronas premotoras glutamatérgicas, los *triángulos negros*, las neuronas CTb⁺ y los *círculos verdes* corresponden a neuronas glutamatérgicas. Fx, fornix; 3V, tercer ventrículo.



B.- Microfotografía de una sección procesada para glutamato y CTb. La célula doblemente inmunopositiva (flechas negras dobles) muestra el característico granulado negro en su citoplasma indicando la presencia de la CTb y un precipitado marrón debido a su naturaleza glutamatérgica. Esta célula es fácilmente reconocible de una neurona exclusivamente glutamatérgica (cabeza de flecha negra).

representadas por las estrellas naranjas. Estas neuronas se encontraron entremezcladas con neuronas únicamente CTb⁺ (triángulos negros) o únicamente NADPH-d⁺ (círculos azules). Las neuronas doblemente marcadas CTb⁺/NADPH-d⁺ presentaron un precipitado marrón en su citoplasma (Fig. 6B, doble cabeza de flecha roja) haciéndolas fácilmente distinguibles de las neuronas NADPH-d⁺ (Fig. 6B, flecha roja).

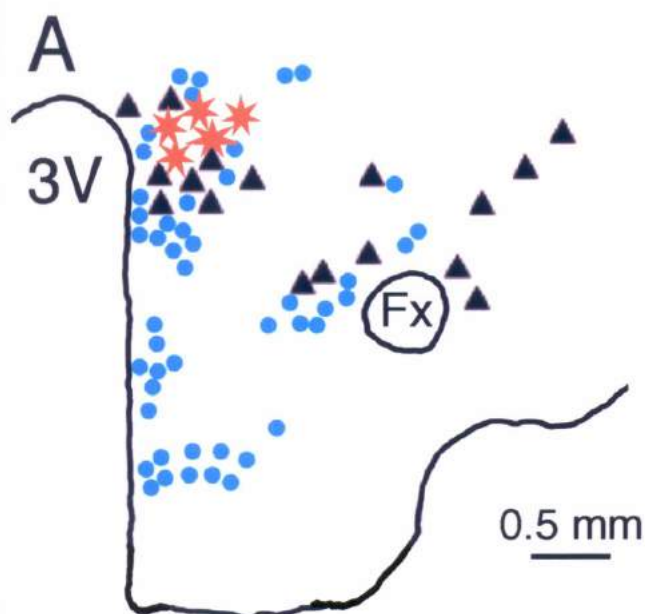
La tinción inmunohistoquímica para la nNOS combinada con CTb confirmó la distribución de las neuronas premotoras nitrérgicas. En la Fig. 6C se observa una microfotografía del sector periventricular del DMH, procesada para la detección de la nNOS y observada con el microscopio de epifluorescencia ($\lambda=594$). La misma sección procesada para la CTb y observada con campo claro se muestra en la Fig. 6D. Las flechas dobles indican la presencia de una neurona doble marcada CTb⁺/nNOS⁺, mientras que la cabeza de flecha amarilla apunta a una neurona nNOS⁺, es de destacar que esta célula no presenta inmunoreactividad para la CTb (Fig. 6D). Estas neuronas nitrérgicas premotoras se hallan incluidas dentro de una población de mayor tamaño de neuronas nitrérgicas, que se encuentra localizada en la región periventricular y medial del DMH, el VMH, el PEF y el LHt (Fig. 6A)

Entremezcladas con estas neuronas nitrérgicas, se halló un grupo de neuronas TH⁺ que probablemente sea la contraparte en el cobayo del grupo neuronal adrenérgico A13 descrito en la rata. A pesar de su localización similar no se observaron neuronas doble marcadas CTb⁺/TH⁺ ni NADPH-d⁺/TH⁺.

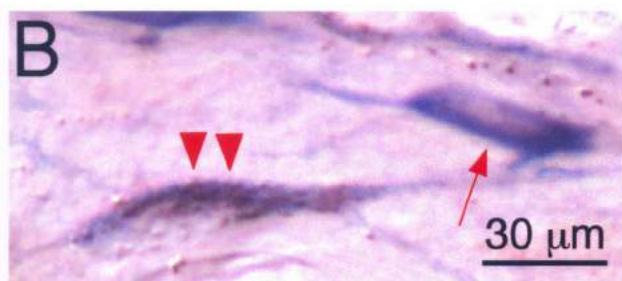
Neuronas premotoras hipocretinérgicas

Una media de 37.3 ± 2.6 de las neuronas CTb⁺ demostró además inmunorreactividad para la Hcr1 (7% del total de neuronas marcadas retrógradamente). Estas se encontraron distribuidas a través del PEF, LHt y DMH lateral, de forma bilateral (18.6 ± 2.8 ipsilaterales y 18.7 ± 1.2 contralaterales). Su localización se encuentra ejemplificada en el diagrama de la Fig. 7A (estrellas rojas). Estas células forman parte de la primer población descrita y se hallaron entremezcladas con otras neuronas inmunorreactivas exclusivamente para la CTb (representadas por los triángulos negros) o para la Hcr1 (representadas por los círculos azules). Las fotomicrografías de las Fig. 7B y

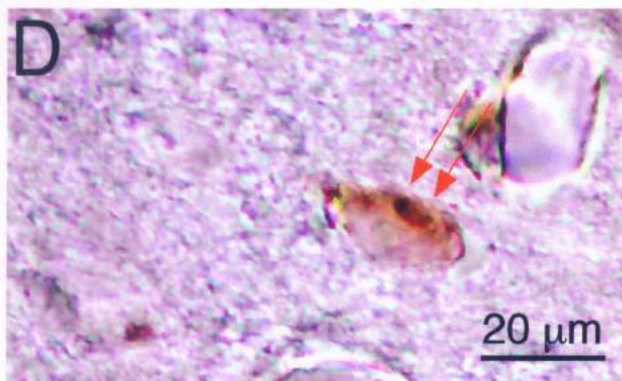
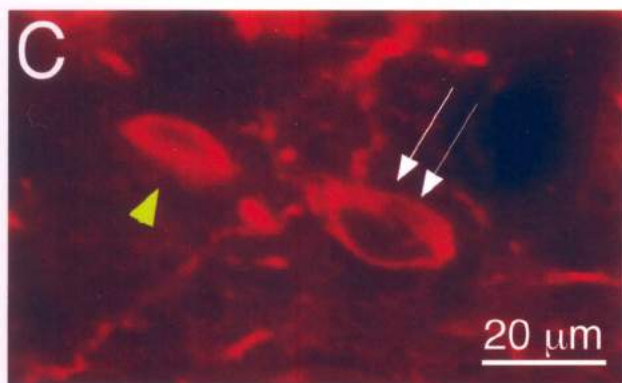
Figura 6. Neuronas premotoras nitrérgicas en el hipotálamo



A.- Diagrama de una sección coronal del hipotálamo procesada para localizar las neuronas premotoras nitrérgicas. Las *estrellas anaranjadas* representan neuronas nitrérgicas premotoras, los *triángulos negros*, neuronas CTb⁺ y los *círculos celestes* muestran neuronas que contienen NO.



B.- Microfotografía de una sección hipotalámica procesada para CTb y NADPH-d en la región del DMH. Se observa una neurona doblemente marcada CTb⁺/NADPH-d⁺ (doble cabeza de flecha roja) como así también una neurona positiva solamente para NADPH-d (flecha roja). C y D.- Microfotografías de la misma sección hipotalámica en el sector periventricular del DMH procesada para CTb y nNOS. Se puede observar en el campo una neurona doblemente marcada (C, doble flecha blanca; D doble flecha anaranjada) como también una neurona inmunopositiva solamente para nNOS (C, cabeza de flecha amarilla). Se observó una misma ubicación para las neuronas doblemente positivas CTb⁺/nNOS⁺ y las neuronas doblemente positivas NADPH-d⁺/CTb⁺. Fx, fornix; 3V, tercer ventrículo



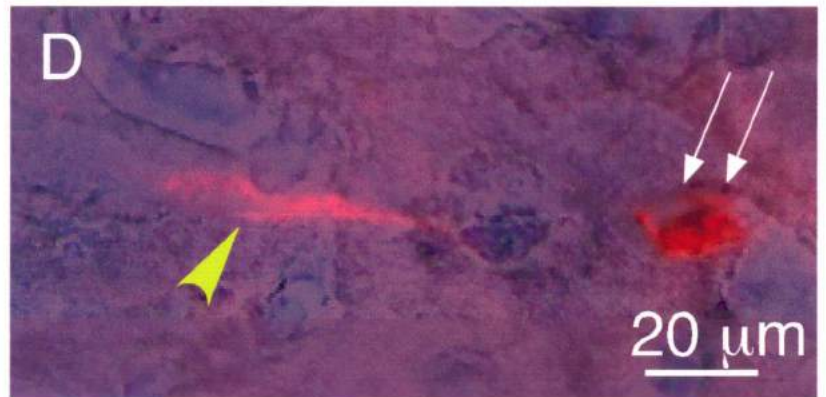
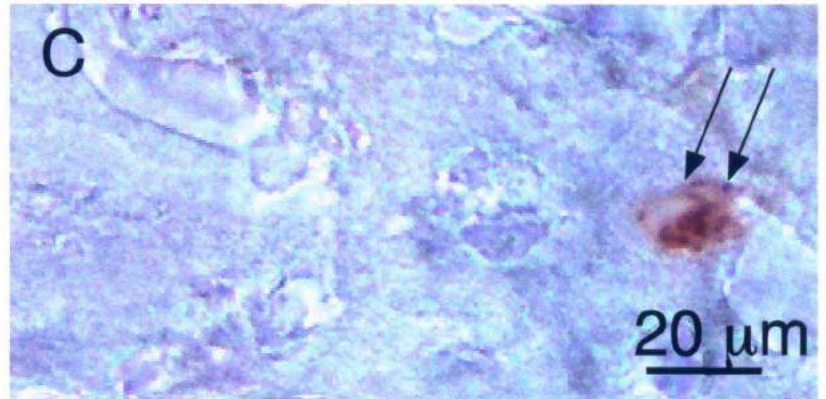
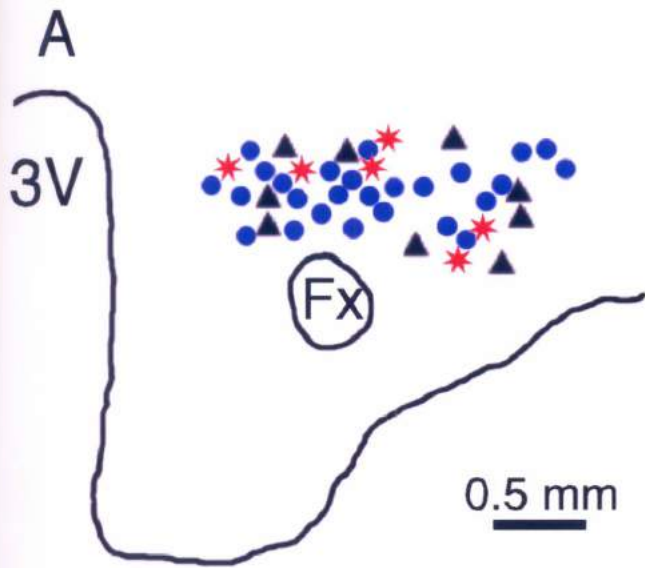
C fueron tomadas de una única sección procesada conjuntamente para la detección por inmunofluorescencia de la Hcrt y para la detección de la CTb mediante el método de la DAB. Cuando la sección es observada con el microscopio de epifluorescencia ($\lambda=594$) se advierte la presencia de dos neuronas inmunopositivas, mientras que cuando se observa con el microscopio de campo claro sólo una neurona se detecta en el campo. Cuando ambas imágenes fueron superpuestas (Fig. 7D) una neurona se revela como doblemente marcada (flechas dobles). En la Fig. 7D, la neurona inmunopositiva exclusivamente para la Hcrt es todavía visible (cabeza de flecha amarilla).

Como ya mencionamos anteriormente, hay estudios que reportan la utilización de glutamato como neurotransmisor clásico por parte de algunas neuronas Hertérgicas (Abrahamson et al., 2001). Para determinar la relación entre ambos fenotipos neuroquímicos realizamos la comparación entre el número de neuronas $CTb^+/Glut^+$ con las $CTb^+/Hcrt^+$. Para este análisis se utilizaron dos animales distintos en los cuales el tamaño de la inyección del marcador retrógrado fue prácticamente idéntica. El número de neuronas $CTb^+/Glut^+$ resultó significativamente mayor que el número de neuronas $CTb^+/Hcrt^+$ (Test de T de Student; $P<0.01$). Esto indica que muchas de las neuronas premotoras glutamatérgicas no son hipocretinérgicas.

Neuronas premotoras MCHérgicas

Una media de 28.2 ± 3.2 neuronas CTb^+/MCH^+ que representan aproximadamente un 5% del total de la población de células CTb^+ fue encontrada en el LHt y el PEF, con una localización tanto ipsilateral (13.4 ± 2.8) como contralateral (14.6 ± 3.2) al sitio de inyección. El diagrama de la Fig. 8A muestra un ejemplo de esta distribución en el cual las estrellas verdes representan las neuronas CTb^+/MCH^+ , los triángulos negros las células exclusivamente CTb^+ y los círculos rojos las exclusivamente MCH^+ . La Fig. 8B muestra una sección observada con el microscopio de epifluorescencia e iluminada con una longitud de onda de 594 nm, en donde se advierte la presencia de dos neuronas rojas, color que corresponde a la inmunoreactividad de la MCH. El mismo campo iluminado con una longitud de onda de 488 nm, revela la presencia de dos neuronas en color verde, en éste caso inmunoreactivas para la CTb (Fig. 8C). Cuando

Figura 7. Distribución de neuronas premotoras hipocretinérgicas en el hipotálamo



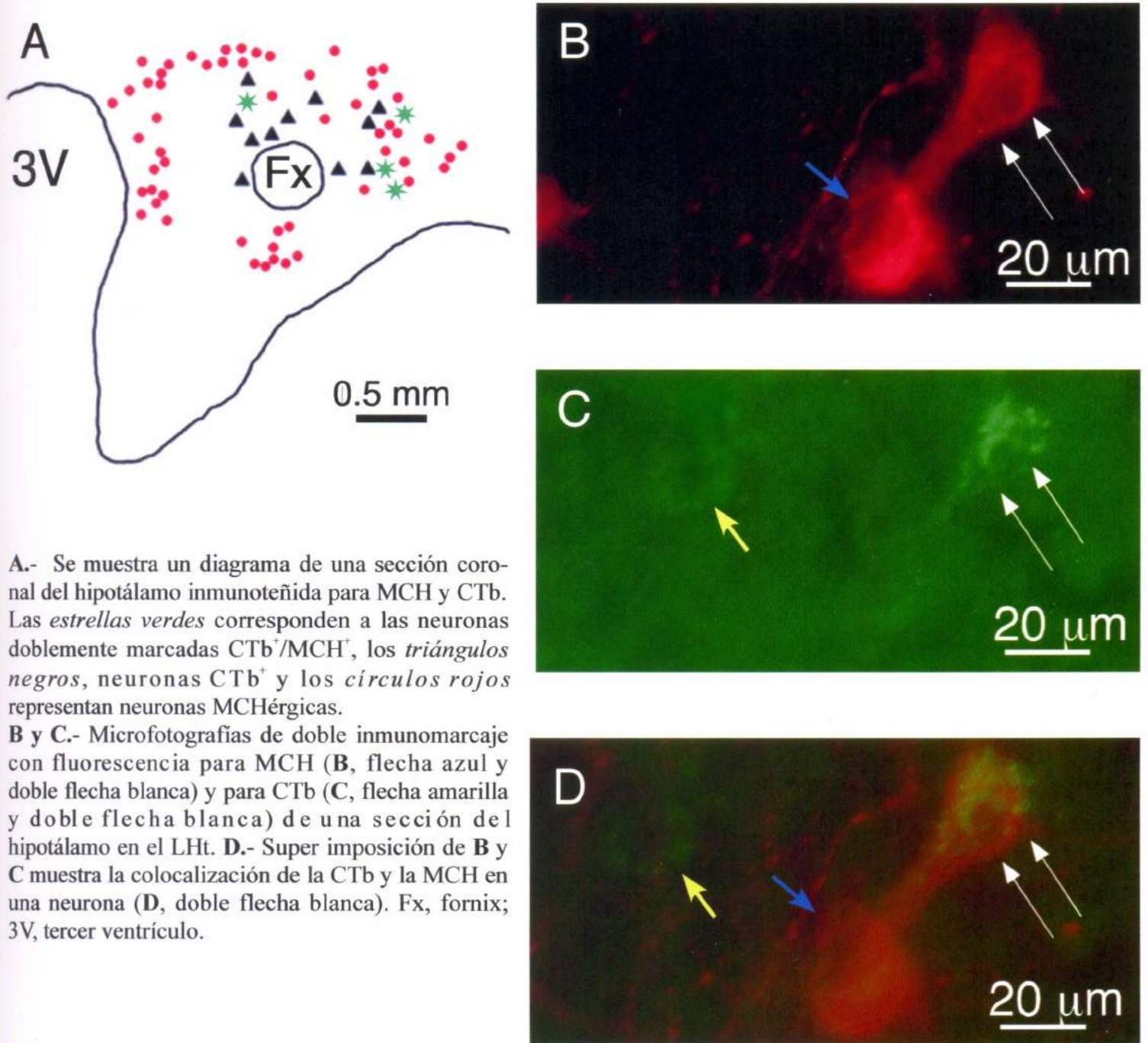
A.- Se muestra un diagrama de una sección coronal del hipotálamo procesada para Hcrt y CTb. Las *estrellas rojas* corresponden a las neuronas doblemente marcadas $Hcrt^+/CTb^+$, los *triángulos negros*, neuronas CTb^+ , y los *círculos azules* representan neuronas hipocretinérgicas.

B y C.- Microfotografías de la misma región hipotalámica en una sección procesada para Hcrt y CTb. **B.-** Se muestra un ejemplo de dos neuronas hipocretinérgicas (cabeza de flecha amarilla y doble flecha blanca). **C.-** Neurona positiva para CTb (doble flecha negra). **D.-** Superposición de **B** y **C** poniendo en evidencia la presencia de una neurona doblemente marcada $Hcrt^+/CTb^+$ (doble flecha blanca). Fx, fornix; 3V, tercer ventrículo.,

ambas microfotografías fueron superpuestas una neurona doble marcada se tornó evidente (Fig. 8D, flechas dobles). La neurona positiva solamente para CTb (flecha corta amarilla) así como la exclusivamente positiva para MCH (flecha corta azul) se mantuvieron visibles luego de la superposición.

En lo que respecta a neuronas GABAérgicas, colinérgicas o monoaminérgicas hipotalámicas, no se halló ninguna que proyectara directamente al mV.

Figura 8. Distribución de neuronas premotoras MCHérgicas en el hipotálamo.



A.- Se muestra un diagrama de una sección coronal del hipotálamo inmunoteñida para MCH y CTb. Las *estrellas verdes* corresponden a las neuronas doblemente marcadas CTb^+/MCH^+ , los *triángulos negros*, neuronas CTb^+ y los *círculos rojos* representan neuronas MCHérgicas.

B y C.- Microfotografías de doble inmunomarcaje con fluorescencia para MCH (B, flecha azul y doble flecha blanca) y para CTb (C, flecha amarilla y doble flecha blanca) de una sección del hipotálamo en el LHt. D.- Super imposición de B y C muestra la colocalización de la CTb y la MCH en una neurona (D, doble flecha blanca). Fx, fornix; 3V, tercer ventrículo.

DISCUSIÓN

En el presente estudio hallamos que el hipotálamo, una estructura diencefálica, proyecta directamente hacia el núcleo motor del trigémino. Sumado a esto se observó que otras dos estructuras, la amígdala ubicada en el telencéfalo y la sustancia nigra pars reticulada que forma parte del mesencéfalo, también proyectan directamente al núcleo motor del trigémino (ver AnexoII). Estos resultados imponen la reevaluación del papel del control suprasegmentario en la generación y/o modulación de los actos motores, que clásicamente fue supuesto se realizaba a través de estaciones de relevo premotoras distribuidas en su mayoría en diferentes sectores del tronco encefálico.

Consideraciones metodológicas

Existen una serie de razones que podrían explicar el hecho de que el fenotipo de neurotransmisor de un gran número de neuronas premotoras ha permanecido indeterminado en nuestros ensayos. Por ejemplo, algunas neuronas glutamatérgicas exhiben una menor inmunoreactividad para el glutamato en su soma comparado con sus terminales (Strom-Mathisen y Ottersen, 1990; Quaglino et al., 1999). Por lo tanto, es posible que la concentración de glutamato somático en algunas de las neuronas marcadas retrógradamente estuviere por debajo de los niveles detectables con los métodos utilizados. Por otra parte, el glutamato es un amino ácido que se encuentra involucrado en el metabolismo general de todas las células, siendo además utilizado por muchas neuronas como neurotransmisor. Por esta razón es necesario utilizar bajas concentraciones del anticuerpo para reconocer al glutamato con el fin de evitar los falsos positivos.

El hecho de que muchas células posiblemente glutamatérgicas no sean reconocidas como tales mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas convencionales, es una limitante conocida del método. Alternativamente se puede utilizar como criterio para identificar a las neuronas glutamatérgicas, la presencia del RNA mensajero para el transportador vesicular de glutamato. Para ello sería necesario utilizar técnicas de biología molecular, como la hibridación *in situ*, que esperamos poder

emplear en una segunda generación de experimentos.

Sin embargo, nosotros observamos grupos de neuronas hipotalámicas, incluyendo neuronas CTb⁺, que presentaron inmunoreactividad para el glutamato. También se observaron neuronas glutamatérgicas distribuidas en otras regiones previamente descritas. Esto indica que la técnica de inmunohistoquímica empleada identificó positivamente las neuronas glutamatérgicas. Sumado a esto, se observaron numerosos terminales glutamatérgicos a través del mesencéfalo, diencéfalo y procencéfalo, como así también en otros sectores del tronco encefálico.

Otra posibilidad alternativa, es que las neuronas premotoras utilicen otro neurotransmisor excitador, todavía no identificado, como el aspartato (Dingledine 1999; Sims y Robinson 1999).

En el presente estudio, con referencia al hipotálamo, no observamos neuronas GABAérgicas en ninguna de las regiones en las que se distribuyeron las neuronas CTb⁺. Pese a ello, Okamura et al., (1990) trabajando con animales tratados con colchicina, describió la presencia de pequeñas neuronas inmunopositivas para GAD en el DMH y áreas perifornicales.

Está bien documentado que las inyecciones de colchicina son necesarias para obtener una buena señal en los ensayos inmunohistoquímicos para evidenciar la presencia de la enzima GAD. La colchicina bloquea el transporte axonal lo que permite la acumulación de esta enzima en el soma de la neurona a niveles que puedan ser detectables mediante técnicas de inmunohistoquímica. En éste estudio optamos por no impedir el tráfico axonal para evitar posibles interferencias con el transporte retrógrado del marcador. Es posible que las neuronas de pequeño tamaño observadas en el hipotálamo en las regiones donde se localizaron las neuronas premotoras, fueran interneuronas GABAérgicas (Fig. 4F y H).

Distribución en el hipotálamo

En el hipotálamo, las neuronas premotoras se distribuyeron en dos poblaciones distintas. Una de las poblaciones se distribuyó en el PEF, el LHt y el sector lateral del DMH (Fig. 4A). Dentro de esta población se hallaron neuronas glutamatérgicas,

hipocretinérgicas y MCHérgicas. La segunda población se observó localizada exclusivamente en el sector periventricular del DMH (Fig. 4B) y contenía neuronas glutamatérgicas y nitrérgicas. Como ya mencionamos, datos previos de nuestro laboratorio establecieron la existencia de terminales hipocretinérgicos en los núcleos motores del hipogloso y del trigémino. Sumado a ello, nuestros datos preliminares sobre la inervación hipotalámica del mXII (Mc Gregor et al., 2004), podrían hacer suponer que estas dos regiones proyectan hacia otros núcleos motores ubicados en el tronco encefálico. A éste respecto, Arita et al., (1995) describió conexiones directas desde el LH hacia las motoneuronas que inervan la musculatura cricotiroidea en la laringe. Este órgano participa en la vocalización y actividades respiratorias que están sujetas a modulación en comportamientos mediados por el hipotálamo.

Los datos experimentales muestran que la distribución de neuronas premotoras hipotalámicas presentó una clara predominancia ipsilateral. Es interesante notar sin embargo, que cuando se analizó la distribución de las neuronas doblemente marcadas, Hcr^{+}/CTb^{+} y MCH^{+}/CTb^{+} , el número de neuronas ipsilaterales fue comparable al contralateral. Este hecho sugiere que el control ejercido por parte de ambos sistemas neuropeptidérgicos es dirigido simétricamente al núcleo motor.

Posibles acciones sinápticas de la inervación hipotalámica sobre las motoneuronas trigeminales.

En éste estudio describimos aferentes glutamatérgicos hacia el mV provenientes desde el hipotálamo. Adicionalmente, demostramos que el hipotálamo puede influir la salida motora del mV a través de por lo menos otras tres sustancias: Hcr, MCH y NO.

El óxido nítrico actúa como neuromodulador, principalmente a través del incremento en los niveles intracelulares de la guanosina 3,5-monofosfato cíclico (cGMP). Previamente en nuestro laboratorio hemos demostrado que la administración de NO provoca una despolarización y un aumento en la frecuencia de descarga de potenciales de acción de las motoneuronas trigeminales (Abudara et al., 2002). La inervación nitrérgica del mV fue descrita como proveniente de una población de células del tronco encefálico ubicada en la porción rostral y ventromedial de la formación reticulada bulbar, que

corresponde al núcleo magnocelular y al aspecto ventral del núcleo gigantocelular (Pose et al., 2005).

En el presente trabajo reportamos otra población neuronal que proyecta aferencias nitrérgicas al núcleo motor del trigémino. Este grupo de células se encuentra ubicada en una discreta región del hipotálamo formando parte de una población más numerosa de neuronas premotoras. El óxido nítrico posee algunas particularidades de entre las que podemos citar su naturaleza gaseosa. Por esta razón no requiere una maquinaria de almacenamiento y liberación especializada, sino que su liberación está supeditada exclusivamente a la activación y localización de la enzima que lo sintetiza. Además, puede atravesar las membranas biológicas directamente, sin necesidad de estructuras de membrana específicas, difundiendo libremente a través del parénquima hasta alcanzar su blanco intracelular. Es posible que la generación de NO por parte de esta población neuronal (3% del total de neuronas CTb⁺ halladas en esa región) afecte al resto de las neuronas premotoras que componen la población, provocando su activación parcial o total, resultando así en una acción coordinada.

Con respecto a la hipocretina, los trabajos realizados por Peever et al., (2003) han aportado evidencia farmacológica indicando un efecto excitatorio indirecto de las mismas a través de la liberación sináptica de glutamato. Sumado a esto, Yamuy et al., (2004) han demostrado que la Hcrt actúa como neuromodulador sobre las motoneuronas ya sea por mecanismos directos así como indirectos. En la mayoría de los otros casos en los que la Hcrt ha sido probada, se reconoce su papel como neuromodulador excitatorio, aunque puede actuar a nivel pre y postsináptico (Sutcliffe y de Lecea, 2002).

En relación al MCH, no hay hasta el momento datos publicados en los cuales se aborde el estudio de los efectos de MCH en motoneuronas somáticas, aunque se ha reportado que las motoneuronas expresan el RNA mensajero para el receptor de MCH (Saito, 2001). En cultivos celulares y rodajas de hipotálamo lateral, se ha descrito que el MCH inhibe la liberación de glutamato y GABA (Gao y van den Pol, 2001), un efecto presináptico opuesto al de la Hcrt. En neuronas del hipotálamo lateral, el MCH también ejerce un efecto inhibitorio a través de las corrientes de Ca⁺⁺ (Gao y van den Pol, 2001). Recientemente ha sido propuesto que la Hcrt y el MCH actúen sobre sus células diana de forma antagónica (Modirrousta et al., 2005). Tomando esto en cuenta, es posible que el

MCH funcione como un neuromodulador inhibitorio que actúe en oposición a los efectos de la Hcrt.

Implicancias comportamentales de la existencia de una región premotora en el hipotálamo.

El hipotálamo se halla involucrado en diferentes y complejos comportamientos que incluyen el sueño, el miedo, la alimentación, la reproducción, etc (Swanson, 1987; Bernardis y Bellinger 1996; Hillebrand et al., 2002). Las neuronas premotoras que nosotros describimos se encuentran involucradas en el control de la musculatura oral, que a su vez tiene un rol protagónico en la mayoría, sino en todos, los comportamientos previamente mencionados. El número total de neuronas premotoras en esta estructura que inervan el mV, aproximadamente 530, es comparable al encontrado en otras estructuras premotoras. Por ejemplo, en estos mismos animales, la formación reticulada bulbar en el tronco encefálico contiene aproximadamente 680 neuronas premotoras (Fabbiani et al., 2005). Dentro de este grupo neuronal existe una subpoblación de neuronas glicinérgicas cuya función esta relacionada con la generación de la inhibición activa que se registra en las motoneuronas trigeminales durante el sueño paradójico (Chase y Morales, 1983). Esto sugiere que el control motor ejercido por el hipotálamo puede ser considerado al menos con la misma importancia al ejercido por esta región del tronco encefálico, por lo menos en lo que a números se refiere.

La diversidad de neurotransmisores/neuromoduladores expresados por las neuronas premotoras de las diferentes regiones del hipotálamo nos conduce a preguntarnos si estas neuronas son activadas para cumplir una función precisa, o desarrollan un comportamiento particular actuando de forma sinergista para lograr el cumplimiento de determinados actos motores. Alternativamente, se podría hipotetizar que los diferentes grupos neuronales fueran activados de forma diferencial en distintos actos motores. Con relación a este último punto, es necesario hacer notar que en el presente trabajo identificamos dos poblaciones de neuronas premotoras anatómicamente distinguibles entre sí. Una de ellas se distribuye mayoritariamente a través del hipotálamo lateral, mientras que la segunda se ubica medialmente, en la región periventricular del

hipotálamo dorsomedial. Tradicionalmente, el hipotálamo lateral ha sido relacionado con comportamientos que incluyen un componente emocional y/o motivacional, mientras que el dorsomedial se halla implicado en la mediación de las respuestas de escape, por ejemplo en situaciones de miedo (Bernardis y Bellinger 1998). Basados en esta evidencia, podríamos suponer que las dos regiones hipotalámicas descritas se hallan involucradas en diferentes actos motores. Sin embargo, estas dos regiones se hallan interconectadas entre sí (Bernardis y Bellinger, 1998), lo que sugiere que ambas poblaciones neuronales generan una respuesta integrada y coordinada durante la ejecución de los distintos actos motores.

Conclusiones finales

Tradicionalmente se ha considerado que solamente los primates poseen inervación suprasegmentaria, específicamente desde la corteza, hacia los núcleos motores del tronco encefálico. Este estudio demuestra la necesidad de una reevaluación de éste concepto, basados en los importantes contingentes de neuronas premotoras que se distribuyeron a través de tres estructuras suprasegmentarias (ver Anexo II). Además, su número, fenotipo y distribución, sugieren una importante función en la salida motora. Es importante notar que las neuronas CTb⁺ se ubicaron exclusivamente ipsilaterales al sitio de inyección para el caso de la SNpr y el CeA (ver Anexo II) , mientras que en el hipotálamo se observaron neuronas premotoras a ambos lados, aunque con una clara predominancia ipsilateral. Esto sugiere una importante lateralización en la modulación de la salida motora. Este hecho es interesante debido a que la mandíbula es una estructura ósea cuyo movimiento implica la coordinación bilateral de los grupos musculares involucrados en sus movimientos. Por esta razón es de suponer que existe una estructura o un sector dentro del cerebro anterior que integra y coordina la información motora que luego será destinada a las tres estaciones premotoras suprasegmentarias descritas.

Por último, la inervación del mV por estas estructuras plantea la pregunta acerca de cómo se hallan involucradas en la modulación de la actividad de las motoneuronas. Una posibilidad es que cada una de las estructuras, actuando sola o en combinación con el resto de las estaciones premotoras, participe directamente en la génesis del acto motor.

Alternativamente, se podría hipotetizar que estas tres estructuras pueden modular la actividad de la motoneuronas a través de la generación de un tono excitatorio o inhibitorio, lo que permitiría suponer un aumento en la eficacia sináptica de aquellos neurotransmisores responsables de la generación y/o la continuación del acto motor.

Son necesarios un mayor número de estudios para poder continuar desentrañando la anatomía y la fisiología de esta nueva relación entre las estructuras suprasegmentarias y los núcleos motores del tronco encefálico. Por último es necesario destacar que como por lo general sucede con los resultados de las investigaciones, son más los caminos que se abren que los que terminan.

Parte de los resultados de este trabajo han sido ya publicados.

Direct hypothalamic innervation of the trigeminal motor nucleus: a retrograde tracer study. McGregor R., Damián A., Fabbiani G., Torterolo P., Pose I., Chase M, Morales F.R. *Neuroscience* 136: 1073-1081, 2005.

Bibliografía

Abrahamson E.E., Leak R.K., Moore R.Y. 2001. The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport*.12: 435-440.

Abudara V., Alvarez A. F., Chase M. H. and Morales F. R. 2002. Nitric oxide as an anterograde neurotransmitter in the trigeminal motor pool. *J Neurophysiol*. 88: 497-506.

Aggleton J.P. 1992 The functional effects of amygdala lesions in humans: A comparison with findings from monkeys. In: Aggleton, J.P. (Ed.), *The Amygdala*, 483-503, Wiley-Liss, New York.

Anand B.K., and Borbeck J.R. 1951. *Yale J. Biol. & Med.* 24: 123.

Arita H., Kita I. and Sakamoto M., 1995. Two distinct descending inputs to the cricothyroid motoneuron in the medulla originating from the amygdala and the lateral hypothalamic area. *Adv Exp Med Biol*. 393: 53-58.

Armony J. L., Servan-Schreiber D., Cohen J. D., and Ledoux J. E. 1995. An anatomically constrained neural network model of fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 1(29): 246-57.

Azmitia E.C., and Segal M. 1978. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 179: 641-668.

Barbas H and De Olmos J. 1990. Projections from the amygdala to basoventral and mediodorsal prefrontal regions in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 300(4): 549-71.

Batten T.F.C., Gamboa-Esteves F.O., Saha S. 2002. Evidence for peptide co-transmission in retrograde- and anterograde-labelled central nucleus of amygdala neurones projecting to NTS. *Autonomic Neuroscience:Basic and Clinical*. 98: 28-32.

Batuev A.S., and Gafurov B.G. 1993. The chemical nature of the hypothalamocortical activation underlying drinking behavior. *Neurosci Behav Physiol.* Jan-Feb; 23(1): 35-41.

Bennett-Clarke C., Romagnano M.A., Joseph S.A. 1980. Distribution of somatostatin in the rat brain: telencephalon and diencephalon. *Brain Research.* 188: 473-486.

Bernardis L.L., and Bellinger L.L. 1987. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res.* 434(3): 321-81.

Bernardis L. L. and Bellinger, L. L., 1996. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 20: 189-287.

Bernardis L.L., Bellinger L.L. 1998. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. *Proc Soc Exp Biol Med.* 218(4): 284-306.

Bittencourt J.C., Presse F., Arias C., Peto C., Vaughan J., Nahon J.L., Vale W. and Sawchenko P.E. 1992. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J. Comp. Neurol.* 319: 218-245.

Brobeck J.R. 1946. *Physiol. Rev.* 26: 541.

Broberger C. 1999. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript CART neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin-hypocretin and neuropeptide Y1. *Brain Research* 848: 101-113.

Brookhart J.M., Dey F.L., Ranson S.W. 1940. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 44: 61.

Byrum C.E., Ahearn E.P., Krishnan K.R.R. 1999. A NEUROANATOMIC MODEL FOR

DEPRESSION. *Prog. Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat.*, 23: 175-193.

Canteras N.S. and Swanson L.W. 1992. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, subiculum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 324: 180-194.

Canteras N.S., Simerly R.B., and Swanson L.W. 1992. Projections of the ventral premammillary nucleus. *J. Comp. Neurol.* 324: 195-212.

Canteras N.S., Simerly R.B., Swanson L.W. 1994. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 348(1): 41-79.

Castillo P., Pedroarena C., Chase M. and Morales F.R. 1991. A medullary inhibitory region for trigeminal motoneurons in the cat. *Brain Res.* 549: 346-349.

Chase M. H. and Morales F. R., 1983. Subthreshold excitatory activity and motoneuron discharge during REM periods of active sleep. *Science.* 221: 1195-1198.

Chemelli R.M., Willie J.T., Sinton C.M., Elmquist J.K., Scammell T., Lee C., Richardson J.A., Williams S.C., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch T.E., Nakazato M., Hammer R.E., Saper C.B., Yanagisawa M. 1999. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell.* 98: 437-51.

Cheng S., Kuchiiwa S., Gao H., Kuchiiwa T., Nakagawa S. 2003. Morphological study of orexin neurons in the hypothalamus of the Long Evans rat, with special reference to co-expression of orexin and NADPH-diaphorase or nitric oxide synthase activities. *Neuroscience Research.* 46: 53-62.

Chronister R.B., Walding J.S., Aides L.D. and Marco L.A. 1988. Interconnections

between substantia nigra reticulata and medullary reticular formation. *Braha Res Bull.* 21: 313-317.

Chou T.C., Lee C.E., Lu J., Elmquist J.K., Hara J., Willie J.T., Beuckmann C.T., Chemelli R.M., Sakurai T., Yanagisawa M., Saper C.B., and Scammell T.E. 2001. Orexin (Hypocretin) Neurons Contain Dynorphin. *J. Neuroscience.* 21: RC 168: 1-6.

Coggeshall R.E. 1992. A consideration of neural counting methods. *Trends Neurosci.* 15: 9-13.

Coggeshall R.E., Lekan H.A. 1996. Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *J Comp Neurol.* 364: 6-15.

Date Y., Ueta Y., Yamaguchi H., Matsukura S., Kangawa K., Sakurai T. 1999. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 748-53.

Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. 1991. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7797-7801.

DeLong M.R., Crutcher M.D., Andgeorgopoulos A.P. 1983. Relations between movement and single cell discharge in the substantia nigra of the behaving monkey. *J. Neurosci.* 3: 1599-1606.

Deniau J.M., Menetrey A., Charpier S. 1996. The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata : segregated patterns of striatal afferents and relationship to the topography of corticostriatal projections. *Neuroscience.* 73: 761-781.

Dey F.L., Fisher C., Berry C.M., Ranson S.W. 1940. *Am. J. Physiol.* 129: 39.

Dingledine R, M. C., 1999. Glutamate and Aspartate. In: Siegel, G. J., Agranoff BW, Fisher SK, Wayne Albers R, Uhler MD. (Ed.), Basic Neurochemistry Molecular, Cellular and Medical Aspects. Lippincott-Raven, New York.

Fabbiani G., Mc Gregor R., Pose I., Chase M., Morales F. Different neurotransmitter phenotypes of premotor trigeminal and hypoglossal neurons in the medulla of the guinea pig. Program No 749.7, 2005 Abstract viewer/Itinerary planner. Washington Convention Center, Society for Neuroscience CD-ROM.

Ferry B., Sandner G., Di Scala G. 1995. Neuroanatomical and functional specificity of the basolateral amygdaloid nucleus in taste-potentiated odor aversion. *Neurobiol. Learn. Mem.* 64: 169-80.

Finley J.C.W., Maderdrut J.L. and Petrusz P. 1981. The immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 198: 541-565.

Fisher A.E. 1956 *Science.* 124: 228

Fulwiler C.E., and Saper, C.B. 1985. Cholecystokinin-immunoreactive innervation of the ventromedial hypothalamus in the rat: Possible substrate for autonomic regulation of feeding. *Neurosci. Lett.* 53: 289-296.

Funahashi H., Takenoya F., Guan J.L., Kageyama H., Yada T., Shioda S. 2003. Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. *Anat Sci Int. Sep*;78(3): 123-38.

Fung S.J., Yamuy J., Sampogna S., Morales F.R., Chase M.H. 2001. Hypocretin (orexin) input to trigeminal and hypoglossal motoneurons in the cat: a double-labeling immunohistochemical study. *Brain Res.* 903: 257-262.

Gao X. B. and van den Pol A. N., 2001. Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *J Physiol.* 533: 237-252.

Goldstein L.E., Rasmusson A.M., Bunney B.S., Roth R.H. 1996. Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *J. Neurosci.* 4: 787-98.

Gray T. S. 1989. in *Neuropeptides and Stress* (Vol. 1) (Tache, Y., Morley, J. E. and Brown, M. R., eds), pp. 92-106, Springer-Verlag

Gurdjian E.S. 1927. The diencephalon of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 43: 1-114.

Hall R.D., Lindholm E.P., 1974. Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat. *Brain Res.* 66: 23-38.

Hara J., Beuckmann C.T., Nambu T. 2001. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron.* 30: 345-354.

Hawes B.E., Kil E., Green B., O'Neill K., Fried S., Graziano M.P. 2000. The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways. *Endocrinology.* 141: 4524-32.

Hess W.R. 1954. *Diencephalon: autonomic and Extrapyrmidal Functions.* New York: Grune.

Hillebrand J.J.G., d. W. D., Adan R.A.H. 2002. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides.* 23: 2283-2306.

Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. 1991. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 2811-2814.

Ida T., Nakahara K., Katayama T., Murakami N., Nakazato M. 1999. Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats. *Brain Res.* 821: 526-529.

Jia H.G., Rao Z., Shi J. 1997. Evidence of γ -aminobutyric acidergic control over the catecholaminergic projection from the medulla oblongata to the central nucleus of the amygdala. *J. Comp. Neurol.* 381(3): 262-281.

Jones B.E., and Moore R.Y. 1977. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res.* 127: 23-53.

Kawamura Y., and Tsukamoto S. 1960a. Analysis of jaw movements from the cortical jaw motor area and amygdala. *Jap. J. Physiol.* 10: 471-488.

Kawamura Y., and Tsukamoto S. 1960b. Neural descending pathways from the cortical jaw motor area and amygdaloid nucleus to jaw muscles. *Jap. J. Physiol.* 10: 489-498.

Kawauchi H., Kawazoe I., Tsubokawa M., Kishida M., Baker B.I. 1983. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature.* 305: 321-3.

Kiernan J.A. 1999. *Histological and histochemical methods: Theory and Practice.* Butterworth-Heinemann, Oxford. 3 ed: 57-102.

Kluver H., and Bucy P.C. 1937. "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *Am. J. Physiol.* 119: 352-353.

Krieg W.J.S. 1932. The hypothalamus of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 55:19-89.

Kruk M.R. 1991. Ethology and pharmacology of hypothalamic aggression in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15: 527-538.

Lang E.J., and Pare D. 1998. Synaptic responsiveness of interneurons of the cat lateral amygdaloid nucleus. *Neuroscience*. 83: 877-889.

Larsson S. 1954. *Acta Physiol. Scandinav.* 32: 115-118

Le Gros Clarke W.E., Veattie W.E., Riddoch W.E., and Dott N.M. 1938. *The Hypothalamus*. Oliver & Boyd, Edimburgh.

Lin L., Faraco J., Li R., Kadotani H., Rogers W., Lin X. 1999. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*. 98: 365-76.

Ljungdahl A., Hökfeld T., Nilsson G. 1978. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience*. 3: 861-943.

Luppi PH, Fort P, Jouvét M. 1990. Iontophoretic application of unconjugated cholera toxin B subunit (CTb) combined with immunohistochemistry of neurochemical substances: a method for transmitter identification of retrogradely labeled neurons. *Brain Res.* 534(1-2): 209-24.

Marcus J.N., Aschkenasi C.J., Lee C.E., Chemelli R.M., Saper C.B., Yanagisawa Y. 2001. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 435: 6-25.

Marsh D.J., Weingarth D.T., Novi D.E., Chen H.Y., Trumbauer M.E., Chen A.S., Guan X., Jiang M.M., Feng Y., Camacho R.E., Shen Z., Frazier E.G., Yu H, Metzger J.M., Kuca S.J., Shearman L.P., Gopal-Truter S., MacNeil D.J., Strack A.M., MacIntyre D.E., Van der Ploeg L.H.T., Qian S. 2002. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *PNAS*. 99(5):

3240-3245.

Martin D., Tobin A. 2000. Mechanisms controlling GABA synthesis and degradation in the brain. GABA in the nervous system: the View at Fifty years. Eds Martin and Oldsen. Lippincott William and Wilkins. Philadelphia. 2: 25-41.

Maurin Y., Banrezes B., Menetrey A., Mailly P., Deniau J.M., 1999. Three-dimensional distribution of nigrostriatal neurons in the rat: relation to the topography of striatonigral projections. *Neuroscience*. 91: 891-909.

McGregor R.J., Damián A., Fabbiani G., Torterolo P., Morales, F. R. and Chase, M. H. 2004 Hypothalamic innervation of the trigeminal and hypoglossal motor nuclei: A retrograde tracer study. Program No 755.5, 2004 Abstract viewer/ Itinerary planner San Diego, Society for Neuroscience CD-ROM.

Meister B., and Hökfelt T. 1988. Peptide-and transmitter-containing neurons in the mediobasal hypothalamus and their relation to GABAergic systems: Possible roles in control of prolactin and growth hormone secretion. *Synapse*. 2: 585-605.

Merchenthaler I. 1984. Corticotropin releasing factor (CRF)- like immunoreactivity in the rat central nervous system. Extrahypothalamic distribution, *Peptides*. 5 Suppl. 1: 53-69.

Millhouse O.E. 1973. The organization of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res*. 55(1): 71-87.

Modirrousta M, Mainville L, Jones BE. 2005. Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *Eur J Neurosci*. 21(10): 2807-16.

Mogoseanu, D., Smith, A.D., Bolam, J.P., 1993. Monosynaptic innervation of trigeminal motor neurones involved in mastication by neurones of the parvocellular reticular

formation. *J. Comp. Neurol.* 336: 53-65.

Monzon M.E., De Souza M.M., Izquierdo L.A., Izquierdo I., Barros D.M. and De Barioglio S.R. 1999. Melanin-concentrating hormone (MCH) modifies memory retention in rats. *Peptides.* 20: 1517-1519.

Mountcastle V.B., Bloom F.E., Geiger S.R. 1986. *Handbook of Physiology: The Nervous System.* Vol. IV, 413-462. The American Physiological Society, Bethesda, Maryland.

Nahon J.L., Presse F., Bittencourt J.C., Sawchenko P., and Vale W. 1989. The rat melanin-concentrating hormone mRNA encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus. *Endocrinology.* 125: 2056-2065.

Nakamura, S., Muramatsu, S., Yoshida, M. 1990. Role of the basal ganglia in manifestation of rhythmical jaw movement in rats. *Brain Res.* 535: 335-338.

Nakos G, Gossrau R. 1994. When NADPH diaphorase (NADPHd) works in the presence of formaldehyde, the enzyme appears to visualize selectively cells with constitutive nitric oxide synthase (NOS). *Acta Histochem.* 96(3): 335-43.

Nauta W.J.H. 1946. *J. Neurophysiol.* 9: 285.

Nauta W.J.H., and Feirtag M. 1986. *Fundamental Neuroanatomy:* 2-11. Freeman and Company, New York.

Neafsey E.J., Bold E.L., Hass G., Hurley-Gius K.M., Quirk G., Sievert C.F., Terreberry R.R. 1986. The Organization of the Rat Motor Cortex: A Microstimulation Mapping Study. *Brain Res. Rev.* 11: 77-96.

Nishimuta K, Sasamoto K, Ninomiya Y. 2002. Neural activities in the substantia nigra

modulated by stimulation of the orofacial motor cortex and rhythmical jaw movements in the rat. *Neuroscience*.113(4): 915-23.

Ohta M., Sasamoto K. 1999. Neuronal mechanism of rhythmical jaw movements in the rat. *Dent. Jpn. (Tokyo)* 35: 30-33.

Ohta M., Sasamoto K., Kishikawa N. 1995. Neural mechanism of oral sensation-induced rhythmical jaw movements in the rat. In: Morimoto, T., Matsuya, T., Takada, K. (Eds.), *Brain and Oral Functions*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp: 343-347.

Okamura H., Abitbol M., Julien J. F., Dumas S., Berod A., Geffard M., Kitahama K., Bobillier P., Mallet J. and Wiklund L. 1990. Neurons containing messenger RNA encoding glutamate decarboxylase in rat hypothalamus demonstrated by in situ hybridization, with special emphasis on cell groups in medial preoptic area, anterior hypothalamic area and dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience*. 39: 675-699.

Paxinos G. 1995. *The Rat Nervous System*. Second Edition: 215-237. Academic Press, San Diego, California

Peever J. H., Lai Y. and Siegel J. M. 2003. Excitatory effects of hypocretin-1 (orexin-A) in the trigeminal motor nucleus are reversed by NMDA antagonism. *J Neurophysiol*. 89: 2591-2600.

Peyron C., Tighe D.K., van den Pol A.N., de Lecea L., Heller H.C., Sutcliffe J.G. 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*. 18: 9996-10015.

Pose I., Fung S., Sampogna S., Chase M. H. and Morales F. R. 2005. Nitroergic innervation of trigeminal and hypoglossal motoneurons in the cat. *Brain Res*. 1041: 29-37.

Qu D., Ludwig D. S., Grammelpft S., Piper M., Pelleymounter M.A., Cullen M.J., Mathes W.F., Przypek J., Kanarek R. and Maratos-Flier E. 1996. A role of melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior. *Nature*. 380: 243-247.

Quaglino, E., Giustetto, M., Panzanelli, P., Cantino, D., Fasolo, A. and Sassoe-Pognetto, M. 1999. Immunocytochemical localization of glutamate and gamma-aminobutyric acid in the accessory olfactory bulb of the rat. *J Comp Neurol*. 408: 61-72.

Rance T., and Baker B.I. 1979. The teleost melanin-concentrating hormone-a pituitary hormone of hypothalamic origin. *Gen. Comp. Endocrinol*. 37: 64-73.

Ranson S.W. 1939. *A.M.A.Arch.Neurol. & Psychiat*. 41:1

Rapisarda C. and Bacchelli B., 1977. The brain of the guinea pig in stereotaxic coordinates. *Arch Sci Biol (Bologna)*. 61: 1-37.

Rekling, J. C., Funk, G. D., Bayliss, D. A., Dong, X. W. and Feldman, J. L. 2000. Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev*. 80: 767-852.

Roberts G.W., Woodhams P.L., Polak J.M., Crow T.J. 1982. Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the amygdaloid complex. *Neuroscience*. 7: 99-131.

Rolls E.T.1992. Neurophysiology and functions of the primate amygdala. In: *The Amygdala*. J. P. Aggleton, (Ed.), pp. 143-165, Wiley-Liss, New York.

Rossi M., Beak S.A., Choi S.J., Small C.J., Morgan, D.G.A., Ghatei M.A., Smith D.M. and Bloom S.R. 1999. Investigation of the feeding effects of melanin concentrating hormone on food intake - action independent of galanin and the melanocortin receptors. *Brain Research*. 846:164-170.

Saito Y., Cheng M., Leslie F. M. and Civelli O., 2001. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol.* 435: 26-40.

Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H. 1998 Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell.* 92: 573-85.

Salamone J.D., Mayorga A.J., Trevitt J.T., Cousins M.S., Conlan A., Nawab A., 1998. Tremulous jaw movements in rats: a model of parkinsonian tremor. *Prog. Neurobiol.* 56: 591-611.

Saper C.B., Swanson L.W., and Cowan, W.M. 1976. The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 169: 409-442.

Saper C.B., Swanson L.W., and Cowan, W.M. 1979. An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. *J. Comp. Neurol.* 183: 689-706.

Saper C.B. 1996. Any way you cut it: a new journal policy for the use of unbiased counting methods. *J Comp Neurol.* 364:5. Smith O.A. 1956. *Anat. Rec.* 124: 363.

Sasamoto K. And Ohta M. 1982. Amigdaloid induced jaw opening and facilitation or inhibition of the trigeminal motoneurons in the rat. *Cop. Biochem. Physiol.* 73A: 349-354.

Sawchenko P.E., and Swanson L.W. 1983. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* 218: 121-144.

Schwartz M., Sontag K.H., Wand P. 1984. Sensory-motor processing in substantia nigra

pars reticulata in conscious cats. *J. Physiol. Land.* 347: 129-147.

Sheikha S.N., Martin S.B., Martina D.L. 1999. Regional distribution and relative amounts of glutamate decarboxylase isoforms in rat and mouse brain *Neurochemistry International.* 35: 73-80.

Shi Y 2004. Beyond skin color: emerging roles of melanin-concentrating hormone in energy homeostasis and other physiological functions *Shi Y. 2004. Peptides.* 25: 605-1611.

Simerly R.B., and Yong B.J. 1991. Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Mol. Endocrinol.* 5: 424-432.

Sims, K. D. and Robinson, M. B., 1999. Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Crit Rev Neurobiol.* 13: 169-197.

Stefanacci L, Farb CR, Pitkanen A, Go G, LeDoux JE, Amaral DG. 1992. Projections from the lateral nucleus to the basal nucleus of the amygdala: a light and electron microscopic PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol.* 323(4): 586-601

Storm-Mathisen, J. and Ottersen, O. P., 1990. Immunocytochemistry of glutamate at the synaptic level. *J Histochem Cytochem.* 38: 1733-1743.

Sutcliffe, J. G. and de Lecea, L., 2002. The hypocretins: setting the arousal threshold. *Nat Rev Neurosci.* 3: 339-349.

Sutin J. 1966. The periventricular stratum of the hypothalamus. *Int. Rev. Neurobiol.* 9: 263-300.

Swanson L.W. 1983. The hippocampus and the concept of the limbic system. In "Neurobiology of the Hippocampus". 3-20. Ed. Seifert W. Academic Press, New York

Swanson L.W. 1986. Organization of mammalian neuroendocrine system. In "Handbook of Physiology-The Nervous System". Vol IV, 317-363. Waverly, Baltimore.

Swanson L.W. 1987. The hypothalamus. In "Handbook of Chemical Neuroanatomy" Vol. V, "Integrated Systems of the CNS". Part I, 1-124. Eds. Björklund A., Hökfelt T., and Swanson L.W. Elsevier, Amsterdam.

Tan C.P., Sano H., Iwaasa H., Pan J., Sailer A.W., Hreniuk D.L. 2002. Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. *Genomics*. 79: 785-92.

Teitelbaum P., and Stellar E. 1954. *Science*. 120: 894.

Tortero P., Yamuy J., Sampogna S., Morales F.R., Chase M.H. 2003. Hypocretinergic neurons are primarily involved in activation of the somatomotor system. *SLEEP*. 1

Turner B.H., Mishkin M., Knapp M. 1980. Organization of the amygdalopetal projections from modality-specific cortical association areas in the monkey. *J. Comp. Neurol.* m: 515-543.

van den Pol A.N., and Cassidy J.R. 1982. The hypothalamic arcuate nucleus of rat-A quantitative Golgi analysis. *J. Comp. Neurol.* 204: 65-98.

Van Hoesen G.W., Pandya D.N., Butters N. 1972. Cortical afferents to the entorhinal cortex of the rhesus monkey. *Science*. 175: 1471-1473.

Watts A.G., and Swanson L.W. 1987. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J. Comp. Neurol.* 258: 230-252.

Wayner M.J., Barone F.L., and Loullis C.L. 1981. The lateral hypothalamus and adjunctive behavior. In "Handbook of the Hypothalamus", Vol.III, "Behavioral Studies of the Hypothalamus", Part B, 107-146. Eds. Morgane P.J. and Panksepp J. Dekker, New York.

Whitlock D.G. and Nauta W.J.H. 1956. Subcortical projections from the temporal neocortex in *Macaca mulatta*. *J. Comp. Neurol.* 98: 183-212.

Williams M.N., Faull R.L. 1985. The striatonigral projection and nigrotectal neurons in the rat: A correlated light and electron microscopic study demonstrating a monosynaptic input to identified nigrotectal neurons using a combined degeneration and horseradish peroxidase procedure. *Neuroscience* 14.4: 991-1010.

Willie J.T., Chemelli R.M., Sinton C.M., Yanagisawa M. 2001. To eat or sleep? orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Ann Rev Neurosci.* 24: 429-458.

Yamuy, J., Fung, S. J., Xi, M. and Chase, M. H., 2004. Hypocretinergic control of spinal cord motoneurons. *J Neurosci.* 24: 5336-5345.

Yasui Y., Nakano K., Nakagawa Y., Kayahara T., Shiroyama T., Mizuno N. 1992. Non-dopaminergic neurons in the substantia nigra project to the reticular formation around the trigeminal motor nucleus in the rat. *Brain Research.* 585: 361-366.

Yasui Y., Tsumori T., Oka T., Yokota S. 2004. Amygdaloid axon terminals are in contact with trigeminal premotor neurons in the parvicellular reticular formation of the rat medulla oblongata. *Brain Research.* 1016: 129-134.

Zaborzski L. 1982. Afferent connections of the medial basal hypothalamus. *Adv. Anat. Embriol. Cell Biol.* 69: 1-107.

Zhang J, Sampogna S, Morales F, Chase M. 2002. Co-localization of hypocretin-1 and hypocretin-2 in the cat hypothalamus and brainstem. *Peptides.* 23: 1479.

Zhang J., Luo P. 2002. Orexin B immunoreactive fibers and terminals innervate the sensory and motor neurons of jaw-elevator muscles in the rat. *Synapse.* 44: 106-110.

Zhu Y., Miwa Y., Yamanaka A., Yada T., Shibahara M., Abe Y. 2003. 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.* 92: 259-66.

Zigmond M., Bloom F., Roberts J., Landis S., Squire L. 1999. *Fundamental Neuroscience*, 1013-1026. Academic Press, San Diego.

Anexo I

Constitución anatómica del hipotálamo.

El hipotálamo ocupa el sector ventral del diencefalo, a ambos lados del tercer ventrículo e inmediatamente por encima de la glándula pituitaria. Los límites del hipotálamo son un tanto arbitrarios debido a que esta estructura se fusiona imperceptiblemente con las estructuras adyacentes (Mountcastle et al., 1986). El límite dorsal queda establecido por el surco hipotálamico en la pared medial del tercer ventrículo, aproximadamente en el plano horizontal de la comisura anterior. En este sector el hipotálamo se continua con el subtálamo y la zona incerta. Lateralmente queda limitado por la cápsula interna y el pedúnculo cerebral. La región preóptica constituye la región más rostral del hipotálamo delimitado por la comisura anterior (dorsalmente) y por el núcleo de la banda diagonal de Broca. El extremo posterior forma un continuo con la sustancia gris periaqueductal y el área tegmental ventral, su límite posterior se establece por un plano imaginario definido ventralmente por los cuerpos mamilares y dorsalmente por la comisura posterior.

Para realizar la sistematización de la ubicación anatómica de los núcleos fue necesaria la parcelación del hipotálamo en sectores discretos. La confección de este esquema tiene origen en los trabajos de dos investigadores, Crosby y Woodburne, quienes reconocieron en el hipotálamo tres zonas longitudinales a las que denominaron periventricular, medial y lateral, según su ubicación relativa al tercer ventrículo. Esta división fue más tarde corroborada por datos fisiológicos y conductuales (Swanson, 1987). Otro investigador, Le Gross Clark (1938), se basó en la organización de los grupos neuronales presentes en la zona medial, dividiendo al hipotálamo rostrocaudalmente en cuatro niveles o regiones a las que designó preóptica, supraóptica también llamada anterior, tuberal y mamilar. La superposición de las zonas descritas por Crosby y Woodburne y las regiones de Le Gross Clark, resulta en la parcelación del hipotálamo en doce subdivisiones que contienen todos los núcleos hipotalámicos. En el esquema de la Fig. 1 del trabajo, se representa una ilustración de la disposición de las zonas y las

regiones previamente descritas. Para aumentar la claridad del esquema se hallan representados solamente alguno de los núcleos hipotalámicos. Asimismo, se procederá a una breve descripción anatómica de cada zona descrita (periventricular, medial y lateral) para luego focalizarnos exclusivamente en la región tuberal (en sus tres subdivisiones: periventricular, medial y lateral).

Zona periventricular. Representa la confluencia final de todas las vías de señalización que se hallan relacionadas con el control neural de los lóbulos anterior, intermedio y posterior de la glándula pituitaria. Contiene la mayoría de las neuronas que producen factores liberadores de hormonas. En una analogía con el sistema motor, Swanson y colaboradores se refirieron a éstas neuronas neuroendocrinas como las “motoneuronas del sistema neuroendócrino”, ya que éstas son las ejecutoras de dicho sistema como así lo son las motoneuronas en su par neuromuscular (Swanson, 1986). Además, esta zona contiene otros conglomerados neuronales íntimamente ligados al control neuroendócrino. Desde el punto de vista citoarquitectural, esta zona se caracteriza por presentar neuronas fusiformes de pequeño tamaño. Además es atravesada por un complejo sistema de fibras ascendentes y descendentes que la conectan con el tálamo medial y la sustancia gris periaqueductal (Sutin, 1966; Swanson 1983).

Zona medial. Contiene una serie de núcleos de tamaño relativamente grande, que en su conjunto juegan un papel protagónico en la iniciación de comportamientos con contenido motivacional como los copulatorios, los agresivos o de alimentación (Swanson, 1987). En conformidad con estos datos, el conexionado de estos núcleos es por demás complejo. Posee fuertes relaciones anatómicas con regiones ampliamente distribuidas en el telencéfalo, diencefalo y tronco encefálico. Se piensa que están involucradas con la integración somatomotora, necesaria para la elaboración de respuestas adaptativas apropiadas frente a determinados estímulos exteriores. Su ubicación anatómica en la zona medial los coloca en la órbita de influencia de casi todas las modalidades sensoriales. La mayoría de esta información sensorial realiza un relevo en alguno de los núcleos del sistema límbico en el telencéfalo antes de llegar a la zona medial (Swanson, 1983). Son estas aferencias límbicas las que podrían constituir el punto de inicio para la comprensión de la anatomía funcional de esta zona. Sumada a la información que recibe desde las regiones límbicas, también recibe aferencias desde núcleos situados en el tronco

encefálico, alguno de los cuales son estaciones de relevo para la información visceral. Una importante característica de los núcleos hipotalámicos en la zona medial es que presentan un gran contingente de conexiones bidireccionales con la mayoría de las regiones del sistema límbico y del tronco encefálico. Además, cada uno de estos núcleos poseen un extenso conexionado intrahipotalámico con otros núcleos de la zona medial como así también con grupos neuronales de la zona periventricular. Estas conexiones establecen las rutas anatómicas para la modulación de la función neuroendócrina por parte del sistema límbico. Los núcleos de esta zona tienen conexiones con la zona lateral del hipotálamo, zona esta que se relaciona con aspectos generales del comportamiento y del estado atencional (Wayner et al., 1981).

Zona lateral. Ha recibido gran atención a través de las décadas, aunque los circuitos que la constituyen son todavía hoy difíciles de estudiar. A pesar de las limitaciones técnicas, se han podido diferenciar, en base a criterios neuroquímicos y citoarquitecturales, solamente algunas pocas regiones. La razón primaria que explica estas dificultades, estriba en que la zona lateral se encuentra atravesada por el fascículo longitudinal medial, que puede ser considerado como el sistema de fibras más complejo en el cerebro de mamíferos. Este sistema contiene fibras ascendentes y descendentes, que surgen de aproximadamente 50 grupos neuronales diferentes, que se extienden desde la corteza prefrontal, a través del hipotálamo y la formación reticulada del tronco encefálico, hasta la médula espinal a nivel del sacro. La interpretación de los datos experimentales ha sido compleja debido a que en muchos casos no ha sido posible distinguir si las manipulaciones experimentales efectuadas en esta zona afectan exclusivamente a las neuronas de la zona lateral o además incluyen al haz de fibras de pasaje. A pesar de estas dificultades técnicas, diferentes investigadores han podido relacionar la zona lateral con el procesamiento de la información sensorial y la expresión de comportamientos asociados entre otros con la alimentación (específicamente hambre y sed) (Batuev y Gafurov, 1993; Funahashi et al., 2003) y la agresión (Kruk, 1991). En general esta zona está involucrada en el mantenimiento general de la vigilancia y en la sensibilización sensorial, producto de los comportamientos motivados, con la capacidad de modular directamente la actividad de las vías espinales modificando así la salida motora.

Región Tuberal; morfología y conexionado

Zona Periventricular

La región tuberal de la zona periventricular (ver Fig. 1) se halla ocupada en su mayoría por el núcleo periventricular intermedio (PeI), que es continuo con el núcleo periventricular anterior (PeA) y se extiende caudalmente hasta el núcleo arcuato (Arc) a lo largo del tercer ventrículo (van den Pol y Cassidy, 1982). El Arc se extiende desde el receso infundibular y yace a lo largo de éste receso durante toda su extensión. Basados en tinciones histoquímicas se pueden reconocer dos subdivisiones; una parte dorsomedial constituida por células de pequeño tamaño y un sector ventrolateral que contiene neuronas de tamaño mediano (Meister y Hökfelt, 1988; Simerly y Yong, 1991). Muchas neuronas de este núcleo contienen hormonas tróficas hipofisarias que son liberadas en la zona neurohemal de la eminencia media hacia el sistema porta hipofisario que a su vez comunica con el lóbulo anterior de la glándula hipófisis.

Recibe gran inervación desde otros sectores de la zona periventricular como así también desde diferentes núcleos de la zona medial (Zaborzski, 1982; Sawchenko y Swanson, 1983; Canteras et al., 1992). Las proyecciones se encuentran confinadas a la región periventricular evitando particularmente el núcleo supraquiasmático (SCh). Su conexionado extrahipotalámico se registra poco denso pero recibe aferencias desde el núcleo base de la stria terminal y varios sectores del tronco encefálico (Swanson, 1987, Azmitia y Segal, 1978, Jones y Moore 1977) y sus eferencias abarcan el sector ventral del núcleo septal lateral.

Zona Medial

En esta zona, la región tuberal se halla compuesta por dos núcleos voluminosos y bien diferenciados: el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH) y el núcleo hipotalámico dorsomedial (DMH).

Núcleo Hipotalámico Ventromedial

El VMH es el grupo neuronal más grande en la región tuberal y en él se pueden distinguir dos conglomerados celulares que reciben el nombre de dorsomedial (VMHDM) y ventrolateral (VMHVL) (Gurdijian, 1927), separados por una zona de menor densidad celular denominada central (VMHC).

El VMH se encuentra envuelto por una cápsula de fibras, también llamada corteza, que lo separa del resto de las células hipotalámicas (Millhouse, 1973). El mayor contingente de aferencias de este núcleo proviene de los núcleos basomedial y posterior de la amígdala y el subículo medial (Canteras y Swanson, 1992). Además recibe innervación desde todas las regiones de la zona medial, área hipotalámica posterior y el SCh (Saper et al., 1979; Watts y Swanson, 1987).

Dentro de las aferencias provenientes del tronco encefálico podemos destacar aquellas provenientes del núcleo parabraquial, por estar éstas relacionadas con los comportamientos afágicos (Fulwiler y Saper, 1985). Por otro lado, sus eferencias incluyen sectores de la zona medial, la amígdala, el septum, núcleo base de la stria terminal y regiones del tronco encefálico como la sustancia gris periaqueductal que a su vez proyecta a los ganglios basales y a la médula espinal (Saper et al., 1976; Canteras et al., 1994). Son estas últimas conexiones las que apoyan el rol del VMH como mediador de los complejos comportamientos con componente motivacional.

Núcleo Hipotalámico Dorsomedial

El DMH ocupa la mitad dorsal de la región tuberal entre el núcleo hipotalámico anterior (AH) y el área hipotalámica posterior (PHA). Este núcleo está compuesto por un sector posterior de mayor densidad celular en relación con su sector anterior y ventral. Asimismo también se puede reconocer un sector periventricular y un sector lateral según el eje mediolateral.

Con respecto a su conexionado se han demostrado relaciones directas e indirectas con los componentes simpático y parasimpático del sistema nervioso autónomo. También se halla conectado recíprocamente con el núcleo del tracto solitario, el núcleo

parabraquial y la columna simpática mediolateral, lo que lo coloca bajo la influencia de las aferencias periféricas. Su conexionado incluye además al mesencéfalo y al origen del tracto hipotálamo reticular, pudiendo influir sobre la actividad de la formación reticulada activadora ascendente y por lo tanto sobre el estado general de alerta (Bernardis y Bellinger, 1987).

Se halla relacionado anatómicamente con la corteza motora precentral, considerada como la zona ejecutora de los comandos motores; áreas sensoriomotoras, involucradas con el procesamiento sensorial; el hipocampo, eje de los procesos cognitivos; el núcleo paraventricular, protagonista del sistema neuroendocrino y el SCh, referido como el principal reloj circadiano (Bernardis y Bellinger, 1998).

En relación a su conexionado intrahipotalámico, se han registrado conexiones con el área hipotalámica lateral y el VMH, ambos considerados clásicamente los centros hipotalámicos de la alimentación, pudiendo modular su actividad y con ello la información de salida de estos dos loci hipotalámicos. Por último, este núcleo se halla en directa relación con los órganos circumventriculares como el área postrema, organum vasculum lamina terminalis y el órgano subfornical, que lo ponen en contacto directo con la barrera hematoencefálica (Bernardis y Bellinger, 1998).

Zona Lateral

La zona lateral podría subdividirse en cuatro regiones: preóptica, anterior, tuberal y mamilar. Sin embargo, no han surgido criterios precisos para su delimitación en estas divisiones, por lo que generalmente se considera dividida en dos regiones: el área preóptica lateral (LPO) y al área hipotalámica lateral (LH). Sólo abordaremos la descripción de esta segunda región.

El LH puede ser subdividido rostrocaudalmente en tres divisiones respectivamente que corresponden a los sectores hipotalámicos anterior (LHa), tuberal (LHt) y mamilar (LHp).

El LHa es la continuación del LPO en sentido caudal y se encuentra limitado medialmente por el área hipotalámica anterior y las columnas descendientes del fórnix. Lateralmente se funde con la sustancia innominata y la amígdala. Esta subdivisión es

sustituida por el LHt en el nivel tuberal que se encuentra limitado lateralmente por el tracto óptico, la cápsula interna y por el núcleo subtalámico. Dentro del LHt se encuentra el núcleo tuberal (TU), cuyo conexionado es similar al del VMH (Canteras et al., 1994). También se puede reconocer un sector alrededor del fórnix al que se denomina núcleo perifornical (PEF, no mostrado en el esquema de la Fig. 1). Finalmente, en su extensión más caudal, el LHt es sustituido por el LHp. Esta división comienza en el complejo mamilar, y se une sin límites anatómicos definibles con el área tegmental ventral. Medialmente éste se encuentra limitado por el fórnix, el tracto mamilotalámico y el área hipotalámica posterior, encontrándose separado dorsalmente del tálamo por la zona incerta y los campos de Forel.

El conexionado de la zona lateral es extremadamente complejo y aunque se han descrito aferencias desde el fascículo longitudinal medial hacia diferentes neuronas en esta zona, el patrón de inervación general permanece esquivo a los diferentes estudios anatómicos. Aún así, se ha conseguido demostrar aferencias desde la amígdala, el septum, el hipocampo y el tronco encefálico.

Con respecto a las eferencias de la zona lateral, se ha reportado un extenso sistema de proyección que incluye la corteza cerebral, sectores de la amígdala y el septum, la sustancia innominata, parte del tálamo, varios sectores de las zonas periventricular y medial del hipotálamo, numerosos núcleos del tronco encefálico y de la médula espinal. En referencia específica a su relación con el tronco encefálico, se ha descrito un gran contingente de conexiones, muchas de ellas recíprocas. Estas regiones incluyen núcleos de relevo de la información sensorial y visceral como el núcleo del tracto solitario y el núcleo parabraquial. También se relaciona con núcleos involucrados en los mecanismos de control somatomotor como el área tegmental ventral y la sustancia nigra, el hipotálamo posterior y la región locomotora mesencefálica.

Región Tuberal; composición neuroquímica

Este resumen acerca del conexionado de esta región particular del hipotálamo, permite apreciar su importancia en la generación y modulación de una gran cantidad de funciones que incluyen diferentes tipos de comportamientos. Su protagonismo se halla reflejado no solamente en el complicado entramado anatómico de aferencias y eferencias, sino también en el gran número de neurotransmisores/neuromoduladores que expresan sus neuronas. Algunos de éstos pertenecen a los considerados neurotransmisores clásicos como el glutamato, ácido gamma amino butírico (GABA), noradrenalina y serotonina. Otros, de naturaleza menos convencional como el gas óxido nítrico (NO), o de origen peptidérgico como la galanina, el neuropéptido Y (NP-Y), la hormona concentradora de melanina (MCH) y la hipocretina (Hcrt).

Anexo II

Amígdala

Introducción

El término amígdala proviene de la palabra griega que designa la almendra. En los primates se halla ubicada en las porciones mediales del lóbulo temporal, rematando el extremo rostral de la formación hipocámpica y el límite anterior del cuerno del temporal del tercer ventrículo (Barbas y de Olmos, 1990; Stefannacci et al., 1992). Esta estructura es un componente central del cerebro basal anterior y se halla implicado en una gran cantidad de funciones regulatorias y comportamentales. Estas incluyen: emociones y memoria, comportamientos sociales como la reproducción y la agresión, y la modulación de procesos autonómicos y endócrinos. Su extensa participación en estos procesos sociales y cognitivos ha llevado a plantear la existencia de un “componente amigdalino” en los mismos.

Con respecto a la compleja anatomía de este núcleo diremos solamente que se halla compuesto de numerosos núcleos, que conforman un complicado entramado neuronal. Sus relaciones anatómicas son extensas y frecuentemente recíprocas e incluyen amplias áreas del neocortex, la corteza entorrinal y el giro cingulado, el hipocampo, el núcleo septal, el tálamo e hipotálamo, los núcleos grises de la base y varias regiones del tronco encefálico (Byrum et al, 1999).

Desde los trabajos pioneros de Johnston en la década de los 20 del siglo pasado, la amígdala fue reconocida como una estructura más abarcativa que su masa ovoide, llegando a diferenciarse la amígdala y la amígdala extendida. Esta última, forma un corredor de neuronas continuo desde el lóbulo temporal hacia el prosencéfalo e incluye el núcleo base de la estría terminal y la zona subpalidal también conocida como sustancia innominada. Un importante componente de la amígdala extendida es el que nos llama la atención, el núcleo central, por concentrar el importante contingente de neuronas premotoras observadas en esta estructura (para mayor detalle sobre la anatomía interna de

la amígdala y la amígdala extendida consultar Paxinos 1995, pp. 495-571).

La amígdala recibe información sensorial compleja desde sectores superiores de la corteza sensorial, la corteza de asociación heteromodal en los lóbulos temporal y frontal, y la corteza insular. (Turner et al., 1980; Van Hoesen et al., 1972; Whitlock y Nauta, 1956). Por lo tanto la amígdala recibe información sensorial que ya ha sido procesada por los centros superiores en donde patrones complejos de información son identificados como objetos, personas, eventos, etc. Luego, la amígdala evalúa y asigna el significado emocional a estos objetos y eventos mediante mecanismos que todavía permanecen oscuros para nosotros. Ha sido demostrado a propósito de la información que pasa por la amígdala, que ésta es interpretada a la luz de experiencias previas resultando en el agregado de un tono afectivo considerable (Rolls, 1992).

Estudios en los que se practicaron lesiones en la amígdala han demostrado su rol en el procesamiento afectivo. Los animales con daño en esta estructura fueron incapaces de procesar el significado emocional de la información sensorial, especialmente aquella asociada al reconocimiento de los estímulos aversivos y el miedo (Kluver y Bucy, 1937; Aggleton, 1992). Sumado a esto, la amígdala está involucrada en el control de la activación de los sistemas monoaminérgicos prefrontales inducido por estrés y la integración de procesos comportamentales y neuroendócrinos de la respuesta al estrés (Armony et al., 1995; Ferry et al., 1995; Goldstein et al., 1996).

Una vez que la amígdala le ha impreso el valor emocional a los eventos que están ocurriendo, sus proyecciones hacia el hipotálamo, los ganglios basales, el tronco encefálico y la corteza, mediarán varios de los aspectos relacionados con la respuesta generada a raíz de la situación planteada.

Resultados

En esta estructura las neuronas premotoras se hallaron localizadas en su núcleo central (CeA) comprendido entre las coordenadas estereotáxicas: AP: +9 a +10.2 según el atlas de Rapisarda y Bacchelli (1977). La Fig. 9A muestra un diagrama realizado con cámara lúcida de esta región en donde los triángulos negros representan neuronas premotoras.

Ejemplos de neuronas marcadas retrógradamente y su distribución se muestran en la microfotografía de la Fig. 9B y C.

Neuronas inmunopositivas para CTb

Un estimado de 1013 ± 128 neuronas que proyectan al mV fue observado en esta estructura y su distribución incluyó las divisiones capsular, medial y lateral del núcleo central. La población celular se encontró dispuesta de tal manera que puede circunscribirse en el plano coronal dentro del área de una elipse, con su diámetro mayor orientado en dirección dorsoventral. Estereotáxicamente esta región se encuentra limitada por las siguientes coordenadas: AP: +9 a +9.9, L: +4 a +6.5 y H: +8 a +11.

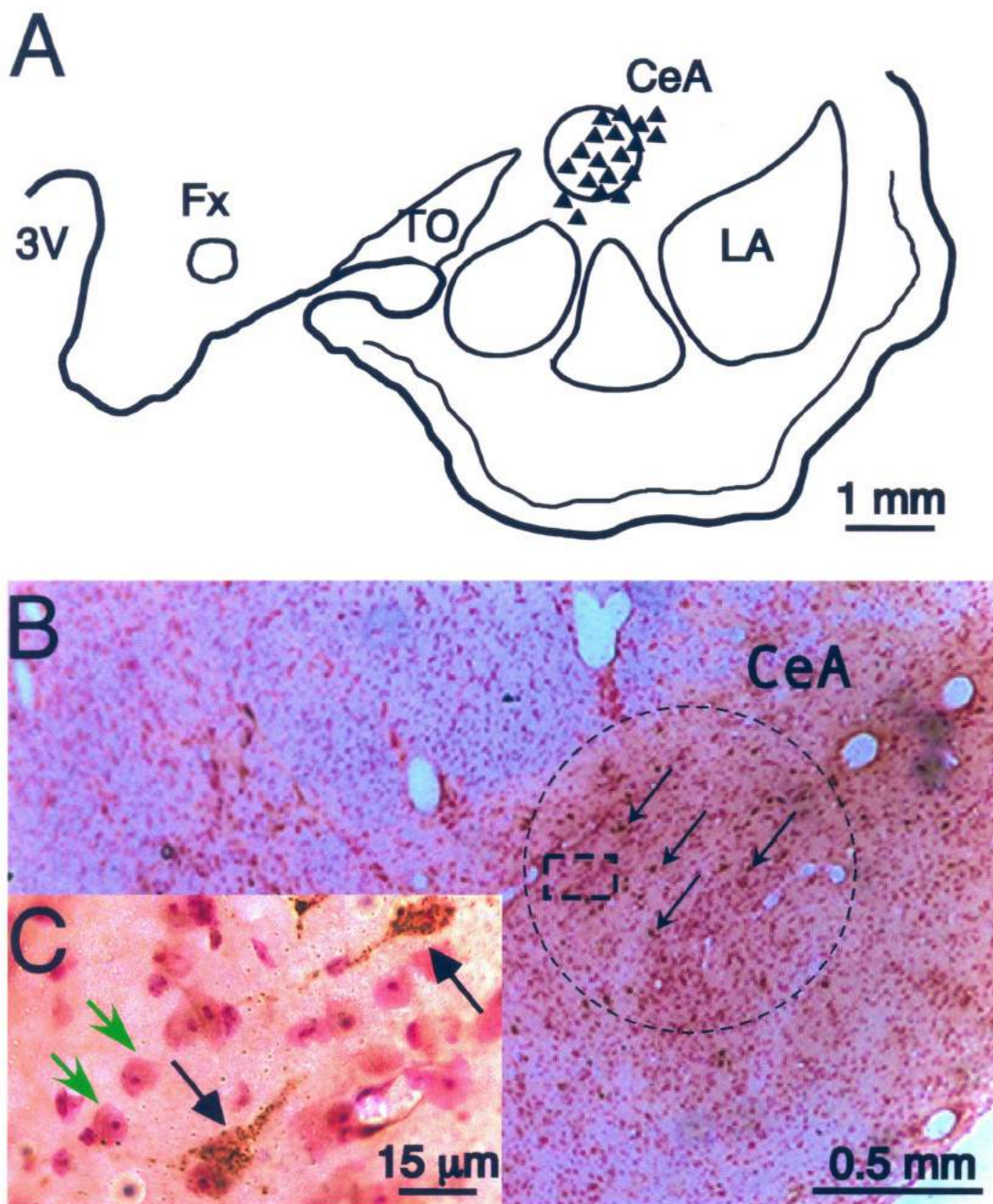
Esta población celular se encontró compuesta mayoritariamente por neuronas con forma multipolar o fusiforme, con un diámetro mayor promedio de $20.27 \pm 5.52 \mu\text{m}$ y un diámetro menor promedio de $10.42 \pm 3 \mu\text{m}$. Su disposición fue exclusivamente ipsilateral con respecto al sitio de inyección.

Como en el caso del hipotálamo, se hallaron pequeñas neuronas entremezcladas con las neuronas CTb⁺. Sin embargo, como se muestra en la microfotografía en la Fig. 9C (flechas verdes), estas neuronas no fueron inmunoreactivas para la CTb. Estas células presentaron forma oval con un diámetro mayor promedio de $7.8 \pm 2.9 \mu\text{m}$ y un diámetro menor promedio de $5.9 \pm 1.7 \mu\text{m}$.

Fenotipos de las neuronas premotoras

La amígdala y específicamente su núcleo central es una región de alta complejidad debido en parte a su participación en diferentes y variadas funciones dentro del SNC. Se ha descrito que sus neuronas contienen una variedad de neuropéptidos (Gray, et al., 1989) así como neurotransmisores clásicos como el GABA (Jia et al., 1997). Además, Lang y Pare (1998) trabajando con técnicas electrofisiológicas, describieron interneuronas GABAérgicas en la amígdala, hecho que fue más tarde corroborado por Sheikh et al (1999) estudiando las poblaciones de neuronas que expresaran GAD en esta estructura.

Figura 9. Distribución de las neuronas premotoras en el núcleo central de la amígdala.



A.-Diagrama de una sección coronal del encéfalo al nivel del núcleo central de la amígdala; los *triángulos negros* corresponden a las neuronas CTb⁺. B.- Microfotografía de una sección procesada para CTb con el método de la DAB y contrateñida con Pironina-Y. Las flechas negras indican las neuronas CTb⁺ localizadas en el núcleo central de la amígdala. C.- Microfotografía a mayor aumento del área delimitada por el rectángulo en (B). Se observan dos neuronas premotoras densamente cargadas con CTb (flechas negras) y neuronas de pequeño tamaño inmunonegativas para la CTb (flechas verdes). Fx, fornix; 3V tercer ventrículo; TO, tracto óptico; CeA, núcleo central de la amígdala; LA, núcleo lateral de la amígdala.

A pesar de ello, de nuestros estudios inmunohistoquímicos y enzimológicos no obtuvimos resultados positivos para el reconocimiento del fenotipo de las neuronas premotoras. Los ensayos realizados fueron los mismos que los realizados para la determinación del fenotipo de las neuronas premotoras localizadas en el hipotálamo. Por lo tanto fueron ensayados conjuntamente con la CTb las siguientes inmunoreacciones: TH, ChAT, nNOS, NADPH-d, GAD 67 y glutamato.

Es posible que las neuronas de pequeño tamaño observadas en la amígdala en las regiones donde se localizaron las neuronas premotoras, fueran interneuronas GABAérgicas (Fig. 9C)

Discusión

Ha sido propuesto que las eferencias amigdalinas hacia el tronco y el hipotálamo median los componentes autonómicos y humorales de la respuesta mientras que los ganglios basales controlan la respuesta motora. Específicamente la amígdala ha sido relacionada, entre otros componentes motores, con los mecanismos de control de los movimientos de la mandíbula. Ya en los años 60, se reportaba que la estimulación eléctrica en la amígdala generaba movimientos rítmicos de la mandíbula. (Kawamura y Tsukamoto, 1960a,b). Mas tarde, Sasamoto y Ohta (1982) utilizando el mismo tipo de estimulación en el núcleo central de la amígdala reportaban la activación de las motoneuronas contralaterales, lo que provocaba la apertura de la mandíbula, así como la inhibición de una parte de la población de motoneuronas que inervan al masetero (músculo de cierre mandibular).

La vía por la cual la amígdala puede modular la actividad de las motoneuronas del mV se ha propuesto recientemente a través de un mecanismo disináptico, desde el núcleo central de la amígdala hacia el mV a través de la región supratrigeminal o la formación reticulada parvicelular del puente, descartándose específicamente los contactos directos entre el CeA y las motoneuronas del mV (Yasui et al., 2004). En el presente estudio hemos demostrado que la amígdala es una estructura premotora que puede influir directamente sobre la actividad de las motoneuronas trigeminales y no necesariamente a

través de estaciones de relevo premotoras. Nuestros resultados estiman un importante contingente de neuronas premotoras localizadas en esta región (aproximadamente 1000). Este número es aproximadamente el doble del encontrado para el hipotálamo y una vez y media el encontrado en la formación reticulada bulbar lo cual sugiere que esta región premotora ejerce una poderosa influencia en la modulación de la salida motora de éste núcleo.

Con respecto a los neurotransmisores/neuromoduladores hallados en la amígdala hay estudios que describen la presencia de un considerable número de neuropéptidos como por ejemplo la somatostatina (Bennett-Clarke et al., 1980), sustancia P (Ljungdahl et al., 1978), encefalina (Finley et al., 1981), factor liberador de corticotropina (Merchenthaler et al., 1984), neurotensina (Roberts et al., 1982), y neurotransmisores clásicos como el GABA (Sheikha et al., 1999) u otro menos convencional como el NO (Batten et al., 2002). Inclusive existe evidencia de que subpoblaciones amigdalinas coexpresen más de una molécula señalizadora, por ejemplo GABA y somatostatina (Batten et al., 2002). Por otro lado se ha descrito que varios núcleos motores del tronco, incluyendo el trigémino, reciben fibras inmunopositivas para varios neuropéptidos de los que se desconoce la localización de los somas neuronales (Rekling et al., 2000). Surge entonces la necesidad de realizar más estudios para poder determinar si desde la amígdala surgen algunas de estas proyecciones neuropeptidérgicas cuyo origen nos es aún desconocido.

Es necesario recordar que esta estructura constituye la segunda aferencia en importancia al hipotálamo. Por consiguiente, además de ejercer un control directo sobre las motoneuronas trigeminales, se podría suponer que el CeA modula la salida motora a través de sus relaciones con el hipotálamo, transformando a éste último en una estación premotora que integre información de diferentes sectores involucrados directa o indirectamente con los actos motores.

Sustancia Nigra

Introducción

Los ganglios basales están constituidos por el cuerpo estriado, el núcleo subtalámico, el globo pálido interno y externo, y la sustancia nigra. Estas estructuras subcorticales que se hallan interconectadas entre sí, se distribuyen en el prosencéfalo, diencefalo y mesencéfalo.

Es comúnmente aceptado que los ganglios basales participan en el control del movimiento, ya que su mayor contingente de aferencias y eferencias los conecta con áreas motoras y la descarga de muchas de sus neuronas se correlaciona con el movimiento. Sumado a esto un daño sufrido en estas estructuras conlleva a desórdenes motores como temblor, rigidez, disquinesia y otros que pueden incluso resultar en movimientos rítmicos e involuntarios de la mandíbula. Además, su conexionado sugiere que los ganglios basales pueden estar involucrados en el procesamiento cognitivo y emocional (Zigmond et al., 1999). Por último es importante tener presente que su mayor salida es inhibitoria, por lo que la activación de sus neuronas provocaría una reducción en la actividad de sus dianas.

La sustancia nigra se halla ubicada en el tegmento ventral del mesencéfalo, extendiéndose desde las coordenadas esterotaxicas AP: +4.2 a +7.4 según el atlas de Rapisarda y Bacchelli (1977). Esta compuesta por tres regiones anatómicamente diferenciadas entre sí. La sustancia nigra pars compacta (SNpc), también denominada región dopaminérgica A9, con una gran densidad celular y compuesta mayoritariamente por neuronas dopaminérgicas (Paxinos, 1995). La segunda región denominada sustancia nigra pars lateralis se considera la extensión lateral de la SNpc. Sus neuronas comparten características fenotípicas y morfológicas con la primer región mencionada. La tercer región se encuentra ubicada debajo de la SNpc y recibe el nombre de sustancia nigra pars reticulada (SNpr). Esta presenta una menor densidad neuronal y se encuentra constituida en su mayor parte por neuronas GABAérgicas (Paxinos, 1995). Esta estructura constituye uno de los núcleos de salida de los ganglios basales, proyectando al tálamo y a estructuras ubicadas en el tronco encefálico. Además, en este núcleo se hallan representados

somatotópicamente la cara y los ojos.

Resultados

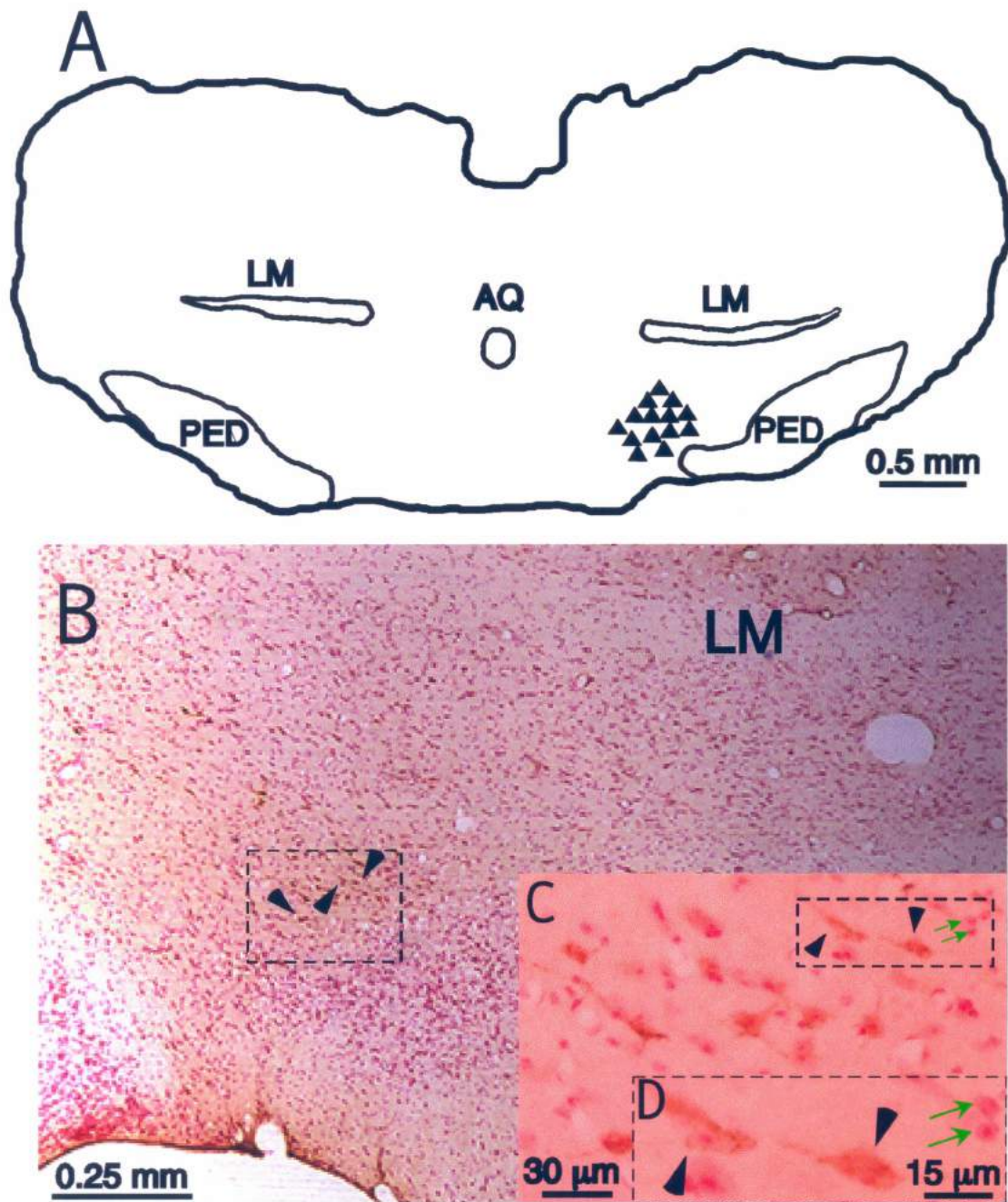
Neuronas inmunopositivas para la CTb

En el sector medial de la SNpr, se halló una población de neuronas marcadas retrógradamente como lo ilustra el diagrama realizado con cámara lúcida en la Fig. 10 (triángulos negros). La microfotografía de la Fig. 10B muestra un ejemplo de un grupo de neuronas marcadas retrógradamente (cabezas de flecha negra). En la Fig. 10C se muestra una imagen en detalle del recuadro de la figura anterior que permite observar a las neuronas con marcaje retrógrado. También se pueden observar neuronas de pequeño tamaño en la cercanía de las neuronas CTb⁺ (flechas verdes). Una imagen a mayor aumento permite apreciarlas con mayor detalle (Fig. 10D).

Se estimó un total de 328 ± 78 neuronas ubicadas en el sector medial de la SNpr que proyectan al mV. La distribución de estas neuronas se extendió dentro de las siguientes coordenadas estereotáxicas: AP: +6.8 a +7.6, L: +1.5 a +2.5, H: +10 a +11, mientras que su disposición en el plano coronal quedó circunscripta por un círculo. La población se halló compuesta por células predominantemente multipolares, con un diámetro mayor promedio de $20.56 \pm 4.16 \mu\text{m}$, y un diámetro menor promedio de $10.67 \pm 2.67 \mu\text{m}$.

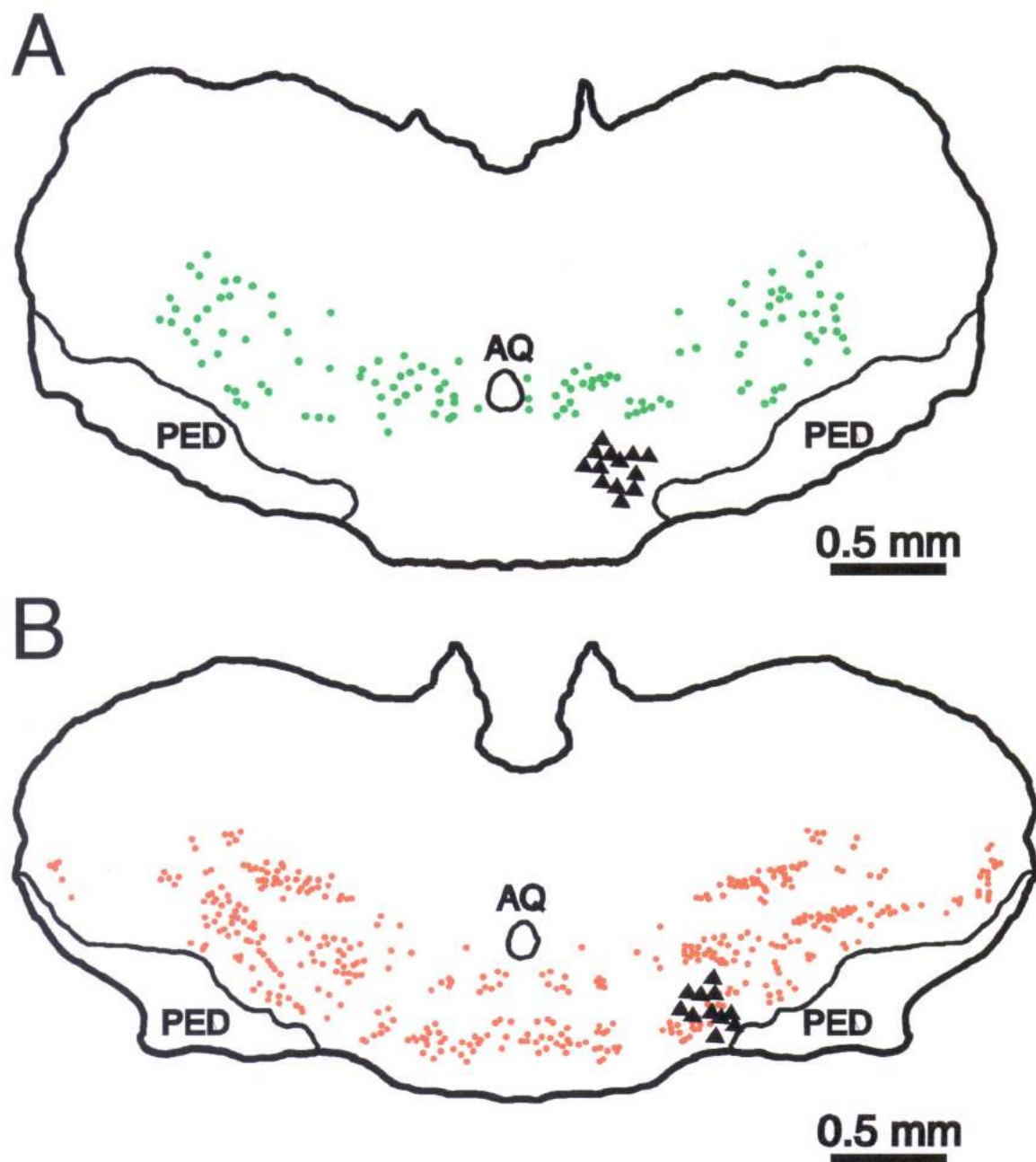
El diagrama de la Fig. 11A es un esquema realizado con cámara lúcida en donde se representa la ubicación relativa de las neuronas marcadas retrógradamente (triángulos negros) con respecto a las neuronas TH⁺ (círculos verdes). La misma figura (Fig. 11B) contiene un diagrama de la distribución de las neuronas CTb⁺ (triángulos negros) en relación a las neuronas GABAérgicas (círculos anaranjados). Estas últimas son un ejemplo de la distribución de las neuronas GABAérgicas en la SNpr.

Figura 10. Distribución de las neuronas premotoras en la sustancia nigra reticulada.



A.-Diagrama de una sección coronal del mesencéfalo al nivel de la sustancia nigra; las neuronas CTb⁺ están representadas por los *triángulos negros*. B.- Microfotografía de una sección procesada para CTb con el método de la DAB y contrateñida con Pironina-Y. Las flechas negras indican neuronas CTb⁺ ubicadas en la sustancia nigra reticulada. C.- Microfotografía a mayor aumento del área delimitada por el rectángulo en (B). Se observan dos neuronas CTb⁺ con su característico granulado marrón (flechas negras), las flechas verdes apuntan a neuronas de pequeño tamaño. D.- Microfotografía a mayor aumento del recuadro en (C).

Figura 11. Distribución de las neuronas premotoras en el sector medial de la SNpr.



A.- Diagrama realizado con cámara lúcida de una sección coronal del mesencéfalo al nivel de la SNpr en donde los *triángulos negros* corresponden a las neuronas CTb⁺ y los *círculos verdes* a neuronas TH⁺. B.- Otro corte similar en donde se muestra las neuronas CTb⁺ (*triángulos negros*) y las neuronas GAD⁺ (*círculos anaranjados*).

Fenotipos neuronales

La SNpr se relaciona tradicionalmente con proyecciones inhibitorias a diferentes regiones del SNC que incluyen el tálamo, colículo superior y núcleos pontinos (Williams y Faull, 1985). Aunque la localización de las neuronas marcadas retrógradamente se superpuso con la de las neuronas GABAérgicas de éste subnúcleo, no se hallaron neuronas doblemente positivas para CTb y GAD67. Asimismo tampoco se obtuvieron resultados positivos (neuronas doblemente marcadas), cuando se realizaron los siguientes ensayos inmunohistoquímicos para determinar su fenotipo; Glut/CTb, TH/CTb, nNOS/CTb, ChAT/CTb y NADPH-d/CTb.

Discusión

La manipulación farmacológica de la SNpr mediante la administración directa de bicuculina, un antagonista de los receptores GABA_A, o glutamato genera movimientos masticatorios (Salamone et al., 1998). Estos movimientos rítmicos parecen estar asociados a los potenciales rítmicos generados en el cuerpo estriado por la microinyección de la picrotoxina, un antagonista de los receptores GABA_A. La mayoría de las neuronas de la SNpr son inhibidas durante las secuencias de los potenciales rítmicos inducidos en el cuerpo estriado (Nakamura et al., 1990). Así también ha sido descrito que las neuronas de la SNpr cambian su patrón de descarga durante los movimientos orofaciales (DeLong et al., 1983).

La estimulación eléctrica del sector sensoriomotor de la corteza encargado de los movimientos orofaciales provoca masticación, movimientos de la lengua y de los labios (Hall y Lindholm, 1974, Neafsey et al., 1986). Asimismo también se pueden generar movimientos masticatorios rítmicos en animales anestesiados mediante la estimulación mecánica de la mucosa del paladar (Ohta y Sasamoto, 1999; Ohta et al., 1995). Utilizando estos dos paradigmas, Nishimuta et al. (2002), demostró que las neuronas de la SNpr eran sensibles a ambos tipos de estimulación. Para el caso de la estimulación cortical, las neuronas expresaron un tipo de respuesta excitatoria, inhibitoria o una

combinación de ambas, mientras que para la estimulación mecánica la actividad neuronal registrada fue de excitación.

Con respecto al sustrato anatómico que permita entender estos datos fisiológicos, se ha reportado que neuronas de la corteza motora orofacial envían proyecciones al estriado ventrolateral, quien a su vez proyecta la SNpr (Deniau et al., 1996; Maurin et al., 1999). Desde aquí sus neuronas envían proyecciones descendentes a la formación reticulada parvicelular en el bulbo raquídeo, la cual posee neuronas premotoras que inervan directamente los núcleos motores de la musculatura oral, por ejemplo el trigémino (Chronister et al., 1988, Mogoseanu et al., 1993). Además la SNpr proyecta a la formación reticulada alrededor del mV, incluyendo la región intertrigeminal y supratrigeminal, las cuales contienen neuronas premotoras trigeminales (Yasui et al., 1992).

Estos estudios anatómicos establecen que la inervación de los núcleos motores por parte de la SNpr es indirecta, utilizando estaciones premotoras de relevo en el tronco. A la luz de nuestros resultados, es necesario reevaluar este concepto ya que demostramos la existencia de una población de neuronas localizada en la SNpr que proyectan directamente hacia el núcleo motor del trigémino. Este hecho sitúa a la SNpr como una estructura premotora que podría modular directamente la actividad de las motoneuronas trigeminales. Como ya mencionamos anteriormente, los ganglios basales pueden hallarse involucrados en el procesamiento de la información emocional. Dentro de la respuesta emocional se encuentran comportamientos que involucran la musculatura orofacial, desde manifestaciones de ataque y defensa a comportamientos maternos. La SNpr a través de su conexionado anatómico podría actuar como una estructura capaz de integrar la información proveniente de diferentes sectores del SNC como por ejemplo la corteza y de manera acorde modificar la salida motora.

Aunque la SNpr posee una gran cantidad de neuronas GABAérgicas, las neuronas premotoras que describimos resultaron negativas para este neurotransmisor. Asimismo, tampoco se evidenciaron como glutamatérgicas ni monoaminérgicas. Son necesarios más estudios para poder determinar el fenotipo de esta población celular, que sin dudas aportaría valiosa información sobre las relaciones anatómo-funcionales entre los ganglios de la base y los núcleos motores del tronco.

DIRECT HYPOTHALAMIC INNERVATION OF THE TRIGEMINAL MOTOR NUCLEUS: A RETROGRADE TRACER STUDY

R. MCGREGOR,^a A. DAMIÁN,^a G. FABBIANI,^a
P. TORTEROLO,^a I. POSE,^a M. CHASE^{b,c}
AND F. R. MORALES^{a,c*}

^aDepartamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Gral Flores 2125, Montevideo-11800, Uruguay

^bDepartment of Physiology, UCLA School of Medicine, Los Angeles, CA, 90024, USA

^cWebSciences International, 1251 Westwood Boulevard, Los Angeles, CA, 90024, USA

Abstract—It is currently thought that the hypothalamus influences motor output through connections with premotor structures which in turn project to motor nuclei. However, hypocretinergic/orexinergic projections to different motor pools have recently been demonstrated. The present study was undertaken to examine whether hypocretinergic/orexinergic neurons are the only source of projections from the hypothalamus to the trigeminal motor nucleus in the guinea-pig. Cholera toxin subunit b was injected into the trigeminal motor nucleus in order to retrogradely label premotor neurons. Two anatomically separated populations of labeled neurons were observed in the hypothalamus: one group was distributed along the dorsal zone of the lateral hypothalamic area, the lateral portion of the dorsomedial hypothalamic nucleus and the perifornical nucleus; the other was located within the periventricular portion of the dorsomedial hypothalamic nucleus. Numerous cholera toxin subunit b⁺ neurons in both populations displayed glutamate-like immunoreactivity. In addition, premotor neurons containing hypocretin/orexin were distributed throughout the lateral dorsomedial hypothalamic nucleus, perifornical nucleus and lateral hypothalamic area. Other premotor neurons were immunostained for melanin concentrating hormone; these cells, which were located within the lateral hypothalamic area and the perifornical nucleus, were intermingled with glutamatergic and hypocretinergic/orexinergic neurons. Nitroergic premotor neurons were located only in the periventricular zone of the dorsomedial hypothalamic nucleus. None of the hypothalamic premotor neurons were GABAergic, cholinergic or monoaminergic.

The existence of diverse neurotransmitter systems projecting from the hypothalamus to the trigeminal motor pool

*Correspondence to: F. Morales, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Gral Flores 2125, Montevideo-11800, Uruguay. Tel: +5982-9243544; fax: +5982-9248784.

E-mail address: f.morales@fmed.edu.uy (F. Morales).

Abbreviations: AP, anteroposterior plane; BSA, bovine serum albumin; ChAT, acetylcholine transferase; CTb, cholera toxin subunit b; DAB, diaminobenzidine tetrahydrochloride; DMH, dorsomedial hypothalamic nucleus; GAD, glutamate decarboxylase; H, horizontal plane; Hcr, hypocretin/orexin; L, lateral plane; LHA, lateral hypothalamic area; MCH, melanin concentrating hormone; mV, trigeminal motor nucleus; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NBT, nitro blue tetrazolium; NDS, normal donkey serum; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate buffer saline; PBST, phosphate buffer saline, 0.3% Triton X-100; PEF, perifornical nucleus; TH, tyrosine hydroxylase; Vref, volume reference.

0306-4522/05/\$30.00+0.00 © 2005 Published by Elsevier Ltd on behalf of IBRO.
doi:10.1016/j.neuroscience.2005.08.028

indicates that this diencephalic structure may influence the numerous functions that are subserved by the trigeminal motor system. © 2005 Published by Elsevier Ltd on behalf of IBRO.

Key words: hypothalamus trigeminal, peptides, nitric oxide, hypocretin/orexin, melanin concentrating hormone.

The hypothalamus is a complex diencephalic structure involved in the control of endocrine and autonomic functions; it also plays a critical role in a variety of emotional and motivated behaviors (Card et al., 1999). Inherent to these behaviors are integrated motor acts in which the activity of various groups of motoneurons is coordinated and their output is modulated by different neurotransmitter/neuromodulator systems (Rekling et al., 2000). However, the hypothalamus has not been previously envisioned to be directly involved in the control of somatic motoneurons; rather, it is currently thought that hypothalamic involvement in motor activities is expressed via its connections with the limbic system, other forebrain regions and brainstem and spinal cord premotor nuclei (Achari and Thexton, 1972; Hosoya and Matsushita, 1981; Simerly, 1995; Inoue et al., 2001).

However, recent data have demonstrated that hypothalamic hypocretinergic/orexinergic projections make direct synaptic contact with somatic motoneurons in the brainstem and spinal cord (van den Pol, 1999; Fung et al., 2001; Zhang and Luo, 2002). The present study was undertaken to determine whether hypocretinergic/orexinergic neurons are the only source of projections from the hypothalamus to brainstem motor pools or whether, as we now demonstrate, other hypothalamic neurotransmitter systems also directly innervate these motoneurons. Accordingly, studies were carried out in the innervation of the trigeminal motor nucleus (mV) of the guinea-pig. We chose to examine trigeminal motoneurons because they participate in numerous motor acts related with hypothalamic driven behaviors such as reproduction, food consumption, aggression, etc. (Swanson, 1987; Bernardis and Bellingier, 1996; Hillebrand et al., 2002).

The location of hypothalamic premotor trigeminal neurons (i.e. neurons that directly innervate the trigeminal motor pool) was determined by using the retrograde tracer, cholera toxin subunit b (CTb), which was injected by iontophoresis into the mV. Double-immunostaining procedures were employed to analyze the neurotransmitter phenotypes of retrogradely-labeled cells.

The results of the present study support the hypothesis that brainstem motoneuron discharge may be modulated

by hypothalamic projections. A portion of these data have been presented previously in abstract form (McGregor et al., 2004).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

The trigeminal motor nuclei of six adult male guinea-pigs, weighing between 500 and 600 g, were injected with CTb. All experimental procedures were approved by the Honorary Commission for Animal Experimentation of the "Universidad de la República," Montevideo, Uruguay, and were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data. Each animal was premedicated with atropine (0.1 mg/kg i.p.) and anesthetized with sodium pentobarbital (35 mg/kg i.p.). The head of each guinea-pig was then positioned in a stereotaxic frame following the instructions of the atlas by Rapisarda and Bacchelli (1977) and the calvarium was exposed. The coordinates of the atlas are as follows: the lateral (L) 0 plane corresponds to the midline plane (between tips of the earbars); the anteroposterior (AP) 0 plane to the interaural line and the horizontal (H) 0 plane to the dorsal most convexity of the cortex 2 mm lateral to the midline. A hole was drilled in the calvarium in order to direct the tip of a glass micropipette, which was filled with NaCl (0.5 M), to the following stereotaxic coordinates: AP: +0.4 mm and L: +2.2 mm. Final localization of the trigeminal motor pool was determined by recording the antidromic field potential evoked by electrical stimulation of the ipsilateral masseter muscle via a pair of nichrome electrodes. Successive tracks (50 μ m apart in the AP and/or medio-lateral direction) were performed until a large amplitude (4 mV) field potential was recorded (Morales et al., 1999). After the location of the motor nucleus was established, the NaCl-filled electrode was replaced with a glass micropipette (15–20 μ m tip diameter) containing CTb (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA), which was dissolved in phosphate buffer (PB) 0.1 M at pH 6. At the site where the masseteric antidromic field potential was of maximal amplitude, CTb was injected by iontophoresis (2 μ A positive current pulses, 7 s on and 7 s off, for 30 min). The micropipette was left in position for 20 min after injection in order to avoid possible leakage during the withdrawal procedure.

Ten to 14 days after the microinjection of CTb, the animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p.) and transcardially perfused with 0.5 l of heparinized (1000 units/l) saline solution followed by 1 l of a solution containing 4% paraformaldehyde, 15% saturated picric acid, and 0.25% glutaraldehyde in PB at pH 7.4. The brainstem and forebrain were removed and immersed for a 24 h post-fixation period in a solution containing 2% paraformaldehyde, 15% saturated picric acid and 20% sucrose in PB 0.1 M at pH 7.4. After post-fixation, the tissue was kept in a solution of sucrose (30%) in PB 0.1 M at pH 7.4 for cryoprotection.

Twenty-four hours later, the brainstem and forebrain were frozen and cut into 30 μ m sections using a Leica CM 1900 cryostat (Nussloch, Germany). Each section was placed in one well of a 12 well tray containing phosphate buffer saline (PBS). The first section obtained was placed in the first well of the tray; consecutive sections were placed in the remaining wells in serial order. Section number 13 was placed in well number 1, and the procedure was repeated until the entire structure was sectioned. Each well contained a sample of the entire structure; subsequent sections in the well were separated by 360 μ m. Using this procedure, neighboring wells contained pairs of adjacent sections. The tissue was stored in 0.1 M PBS containing 0.1% azide. All structures were cut in the coronal plane.

Immunohistochemistry procedures

Immunohistochemical detection of CTb was performed by sequential incubation of free-floating sections. The sections were first incubated in goat anti-CTb serum (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) 1:20,000 in PBS, 0.3% Triton X-100 (PBST). They were then exposed to biotinylated donkey anti-goat serum (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) 1:2000 in PBST, followed by incubation in standard ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 1:400. The tissue was then processed by the diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) method which consisted of tissue immersion in 0.02% DAB and 0.03% hydrogen peroxide in 50 ml of 50 mM Tris buffer, pH 7.5, for 8–10 min.

Unless stated, for all double-staining procedures, the tissue was processed first for CTb; afterward it was stained for other neurotransmitters, except for NADPH-diaphorase (NADPH-d)-labeling in which the nitro blue tetrazolium (NBT) reaction was performed prior to CTb immunostaining.

For glutamate labeling, sections were processed for CTb detection using the DAB nickel-enhanced method, which consists of tissue immersion in 0.6% nickel ammonium sulfate, 0.02% DAB and 0.03% hydrogen peroxide in 50 ml of 50 mM Tris buffer, pH 7.5. The sections were then preincubated in 6% normal donkey serum (NDS) in PBST; they were then exposed to mouse anti-glutamate antibody (Swant, Bellinzona, Switzerland) 1:1500, 3% NDS in PBST and incubated in donkey anti-mouse serum (Jackson ImmunoResearch) 1:200, 3% NDS. Subsequently, the sections were incubated in standard ABC (Vector Laboratories) 1:200. Finally, they were treated by the DAB method without nickel-enhancement.

For hypocretin/orexin (Hcr) labeling, the antibody against Hcr B was chosen due to the fact that Hcr A and Hcr B colocalize in the same neurons (Zhang et al., 2002). Sections were preincubated in 0.5% sodium borohydride (Sigma). After CTb labeling, the sections were incubated first in 50 mM glycine in PBS, 0.1% bovine serum albumin (BSA) and subsequently in 5% NDS, 2% BSA in PBST. They were then exposed to rabbit anti-Hcr B serum (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA) 1:15,000 in PBS, 3% NDS. Thereafter, the tissue was immersed in Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 1:500. Some sections were processed first with the CTb nickel-enhanced method followed by Hcr B labeling with the DAB method which consisted of the sequential incubation in rabbit anti-Hcr B serum (Phoenix Pharmaceuticals) 1:15,000, 3% NDS in PBST and donkey anti-rabbit IgG, 1:300 3% NDS in PBST, followed by ABC 1:200. The sections were then processed with the DAB method.

To detect melanin concentrating hormone (MCH) and CTb, sections were incubated simultaneously in rabbit anti-MCH antibody (Phoenix Pharmaceuticals) 1:2000 and in goat anti-CTb antibody (List Biological Laboratories) 1:6000, 6% NDS. They were then incubated in Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes) 1:200 and Cy2 donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch) 1:200 to reveal immunofluorescent reactivity for MCH and CTb, respectively. Some sections were processed first with the CTb nickel-enhanced method followed by MCH labeling with the DAB method which consisted of the sequential incubation in rabbit anti-MCH antibody (Phoenix Pharmaceuticals) 1:30,000 in PBST, 2% BSA; donkey anti-rabbit IgG, 1:1000, 2% BSA in PBST, followed by ABC 1:400. The sections were then treated with the DAB method.

NADPH-d activity was examined using the NBT method. To detect NADPH-d activity, sections were incubated in a solution of 0.1 M PBS, pH 7.4, 0.3% Triton X-100, 0.1 mg/ml NBT and 1.0 mg/ml of beta-NADPH for 15–20 min at 37 °C. Subsequent CTb immunostaining was performed.

The correlation between NADPH-d histochemical staining and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) immunohistochemical staining has been previously described (Hope et al., 1991). NADPH-d is used as a specific marker for nNOS to map the distribution of nitrenergic neurons and fibers (Dawson et al., 1991).

For nNOS immunostaining, the sections were incubated in 0.5% sodium borohydride (Sigma). After CTb-labeling, the sections were incubated first in 50 mM glycine, PBS, 0.1% BSA, followed by 6% NDS, 2% BSA in PBST; they were then exposed to rabbit polyclonal anti-rat nNOS antibody (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), 1:1000 and incubated in Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes) 1:500, 2% BSA and 6% NDS for the fluorescent detection of nNOS.

To label cholinergic neurons, CTb-labeling with nickel enhancement method was performed followed by immunohistochemistry for acetylcholine transferase (ChAT). Sections were sequentially incubated in goat anti-ChAT polyclonal antibody

(Chemicon International, Temecula, CA, USA) 1:200; donkey anti-goat, 1:100 in PBST and ABC, 1:200. Subsequently, the tissue was treated with the DAB method.

For the detection of tyrosine hydroxylase (TH), the sections were incubated in PBS, 50 mM glycine, 0.1% BSA, followed by CTb-labeling. Then, the sections were incubated in sheep anti-TH IgG (Pell-Freez, Rogers, AR, USA) 1:5000 and exposed to Alexa Fluor 488 donkey anti-sheep IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 1:1000.

For glutamate decarboxylase (GAD) labeling, sections were incubated in 0.5% sodium borohydride (Sigma) followed by CTb-labeling. Thereafter, the sections were incubated in PBS, 50 mM glycine, 0.1% BSA, followed by 6% BSA in PBST; they were then exposed to mouse anti-GAD67 serum (Chemicon International) 1:1000, PBST, 4% BSA. Thereafter, the sections were incubated in Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG (Molecular Probes) 1:500.

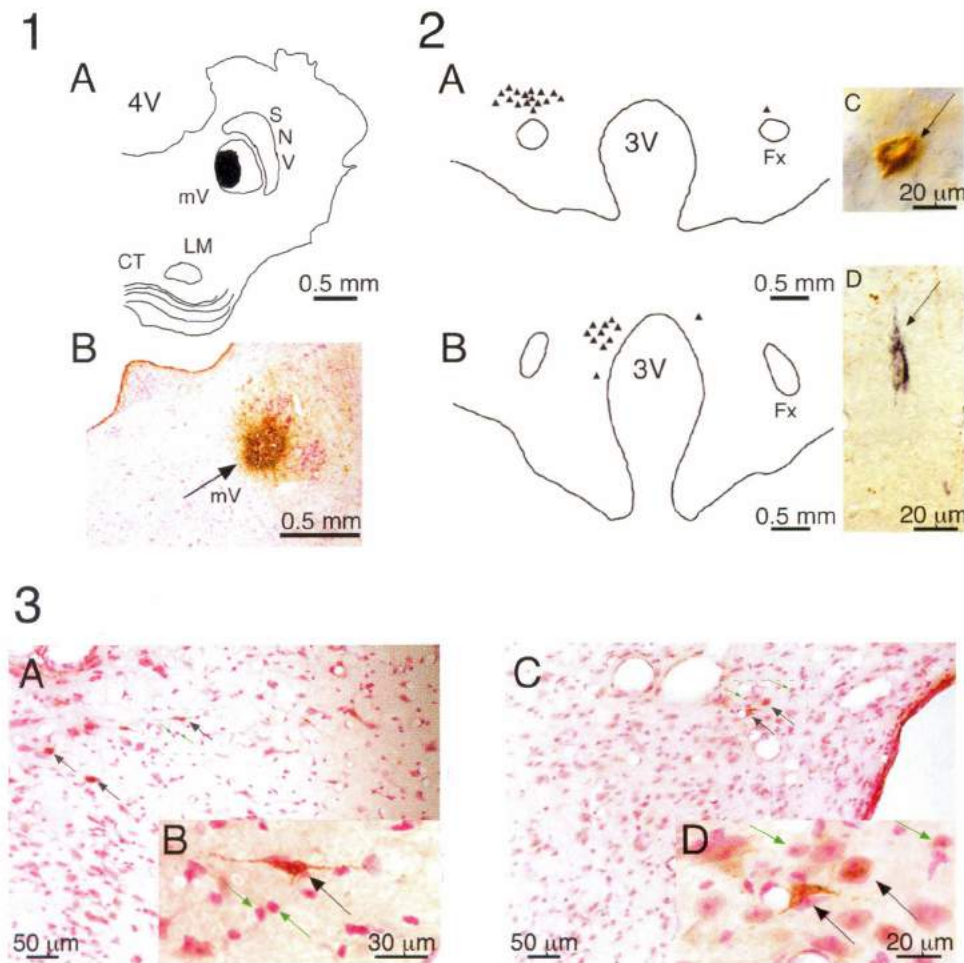


Fig. 1. (1.1) Localization of CTb injection sites in the mV. (A) Diagram of a coronal section of the pons at the level of the mV. The dark areas represent the deposit site of CTb. (B) Photomicrograph of the CTb deposit. The arrow points to the mV. CT, corpus trapezoidum; LM, lemniscus medialis; SNV, nucleus sensorius nervi trigemini; 4V, fourth ventricle. (1.2) Distribution of CTb-labeled cells in the hypothalamus. (A, B) Diagrams of coronal sections of the hypothalamus at the level of the tuberal region. (A) Distribution of CTb⁺ neurons (black triangles) through the LHA, PEF and DMH corresponding to the first population. (B) Distribution of CTb⁺ neurons that belong to the second population that was distributed through the periventricular DMH. (C) (Arrow) Photomicrograph of a neuron located in the periventricular DMH that is heavily-loaded with CTb. The typical brown granules, which are the reaction product of the DAB method, can be seen in the cytoplasm. (D) (Arrow) An example of a CTb⁺ premotor neuron located in the LHA treated with the DAB nickel ammonium sulfate-enhanced method, which produces black stained granules. Fx, fornix; 3V, third ventricle. (1.3) Examples of hypothalamic premotor and non-premotor neurons. Microphotographs of sections of the LH (1.3.A and 1.3.B) and of the periventricular zone of the DMH (1.3.C and 1.3.D) processed for CTb-labeling and counterstained with Pyronin-Y. Black arrows indicate CTb⁺ neurons and green arrows point to small-sized non-CTb⁺ neurons. Insets 1.3.B and 1.3.D are higher magnification microphotographs of the areas encompassed by the rectangles in 1.3.A and 1.3.C, respectively.

In order to determine the size of the somata of non-CTb labeled neurons, the sections were first processed for CTb and counterstained with Pyronin-Y, 0.05% in acetic buffer, pH 6.

To confirm antibody specificity, preabsorption and omission tests were performed for Hcrt B, MCH and nNOS, whereas omission tests were carried out for GAD, TH and ChAT. No positive immunoreactivity was detected in these experiments.

Histological sections were examined using an Olympus BH2 microscope. Neurons processed for CTb-labeling with the DAB method were drawn with the aid of a camera lucida; their major and minor diameters were measured and averaged. A Nikon Eclipse E 600 FN epifluorescence microscope equipped with the appropriate filter set for each probe was used to analyze sections stained with fluorescent antibodies. Images were obtained with a SPOT RT v 3.4 digital camera (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA) and the colocalization of the signals was determined with Adobe Photoshop® (Adobe Systems, Inc.).

To estimate the number of retrogradely-labeled neurons, the stereological disector method, as described by Coggeshall (1992) and Coggeshall and Lekan (1996), was used (see also Saper, 1996). This method requires an estimation of the volume occupied by the regions under study (volume reference or V_{ref}) and an estimation of the "density" (N_d), in this case, of the CTb-labeled neurons in the histological samples. The product $[(V_{ref} \times N_d)]$ yields an estimate of the number of CTb-labeled cells. The same analysis was performed to evaluate the number of double-labeled neurons.

RESULTS

The extent of the CTb injection was examined in several sections from each guinea-pig. A drawing of the injection site in a representative animal is presented in Fig. 1.1A; Fig. 1.1B is a photomicrograph of the same site. The deposit of CTb consisted of a circular central zone of dark reaction product (Fig. 1.1B, arrow) which was surrounded by a lighter-stained zone (probably due to the extracellular diffusion of CTb). The description of premotor neurons in this report corresponds to four animals in which CTb injections were similar to those shown, which were restricted to the mV. In two other animals, which were not used for this study, the injection site was external to the mV.

The number and distribution of immunolabeled neurons were first determined using drawings of histological sections with the aid of a camera lucida attachment. Premotor neurons were observed in the tuberal region of the hypothalamus which extended from stereotaxic coordinates AP: +8.0 to +10.4, according to the atlas of Rapisarda and Bacchelli (1977). The diagrams in Fig. 1.2 (A and B) were obtained from camera lucida drawings of two coronal sections of the tuberal region of the hypothalamus; the black triangles represent the localization of CTb⁺ cells.

CTb retrogradely-labeled neurons

Examples of CTb retrogradely-labeled neurons are shown in Fig. 1.2C and D. CTb⁺ neurons displayed typical brown granules (that are the product of the DAB reaction) within their cytoplasm (Fig. 1.2C, arrow); when the nickel enhancement technique was used the cytoplasmic granules were black (Fig. 1.2D, arrow).

A total of 448.8 ± 48.6 (S.E.M., in this and the following entries) CTb⁺ neurons were located ipsilateral, whereas 83.9 ± 13.9 immunopositive neurons were located con-

Table 1. Summary of the number of trigeminal premotor hypothalamic neurons according to their phenotype and distribution (each number represents the average number of neurons \pm SEM for each category)

Neuronal phenotype	Trigeminal premotor hypothalamic neurons	
	Ipsilateral	Contralateral
CTb ⁺	448 \pm 48.6	83.9 \pm 13.9
Glut ⁺ /CTb ⁺	68.9 \pm 22.5	30.5 \pm 5.2
Hcrt ⁺ /CTb ⁺	18.6 \pm 2.8	18.7 \pm 1.2
NADPH-d ⁺ /CTb ⁺	14.1 \pm 3.1	
MCH ⁺ /CTb ⁺	13.4 \pm 2.8	14.6 \pm 3.2

Data were obtained from four animals.

tralateral to the injection site. Table 1 summarizes the results for all animals. Retrogradely-labeled neurons were located in the dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH), the perifornical nucleus (PEF) and the lateral hypothalamic area (LHA) of the tuberal region of the hypothalamus. According to their location, there were two distinct populations of neurons.

In the first population, neurons were distributed throughout the PEF, LHA and lateral DMH as shown in Fig. 1.2A. The region occupied by these cells is encompassed by the surface of an ellipse with its major axis oriented in the mediolateral direction in the coronal plane. The stereotaxic coordinates of this region were AP: +8 to +9, L: +0.75 to +2.5 and H: +9.5 to +11.0, according to the atlas of Rapisarda and Bacchelli (1977). This group included mainly fusiform and multipolar-shaped neurons with a mean major diameter of $30.0 \pm 8 \mu\text{m}$ and a mean minor diameter of $9.5 \pm 2.5 \mu\text{m}$; it contained 226.9 ± 50.9 ipsilateral and 53.7 ± 9 contralateral CTb⁺ cells.

The second group of neurons was located in the periventricular portion of the DMH, as shown in Fig. 1.2B. In the coronal plane, the region occupied by these cells was circular in shape. The stereotaxic boundaries for this region were AP: +9 to +10, L: 0 to +0.5 and H: +9 to +9.5 according to the atlas of Rapisarda and Bacchelli (1977). These neurons displayed an oval profile with a mean major diameter of $18.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$ and mean minor diameter of $10.6 \pm 3.5 \mu\text{m}$; 221.9 ± 45.9 CTb⁺ cells were ipsilateral and 30.2 ± 5.3 were contralateral.

Both regions contained small neurons that were not labeled with CTb (Fig. 1.3B and D green arrows); these cells were oval shaped (mean major diameter $8 \pm 2.5 \mu\text{m}$, mean minor diameter of $5.6 \pm 1.8 \mu\text{m}$); they were intermingled with the CTb⁺ neurons (black arrow in Fig. 1.3B and D).

Glutamatergic premotor neurons

A total of 99.4 ± 19.9 CTb⁺ neurons exhibited glutamate-like immunoreactivity (68.9 ± 22.5 ipsilateral and 30.5 ± 5.2 contralateral). This number corresponds to approximately 19% of the total number of CTb retrogradely-labeled cells, which were located in the DMH, LHA and PEF; they included neurons of both of the previously described populations. An example is shown in the diagram of Fig. 2A, wherein the violet stars represent CTb⁺/Glut⁺ cells, the

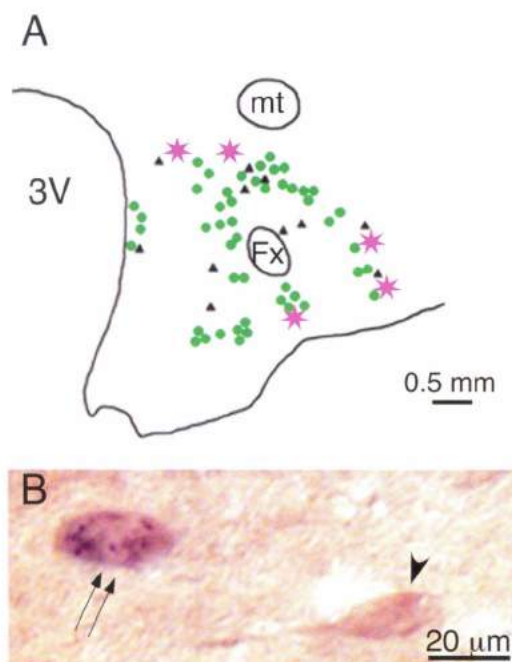


Fig. 2. Distribution of glutamatergic premotor neurons in the hypothalamus. (A) Diagram of a coronal section of the hypothalamus processed for glutamate and CTb. Violet stars represent glutamatergic premotor neurons; black triangles correspond to CTb⁺ neurons and green circles to glutamatergic neurons. (B) Microphotograph of a section processed for glutamate and CTb. The double-labeled cell (double black arrow) shows the characteristic black granules in its cytoplasm due to the presence of CTb and a brown precipitate indicating its glutamatergic nature. This cell is easily distinguishable from the single-labeled glutamatergic neuron (black arrowhead).

black triangles single-labeled CTb⁺ neurons and the green circles single-labeled glutamatergic cells. Double arrows in Fig. 2B point to a representative hypothalamic glutamatergic premotor neuron displaying the brown cytoplasm that corresponds to glutamate-like immunoreactivity and a black granular precipitate indicating the presence of retrogradely-transported CTb. In the same field, a single-labeled glutamatergic neuron is also present (Fig. 2B, single arrowhead).

Hypocretinerig/orexinergic neurons

A total of 37.3 ± 2.6 CTb⁺ cells displayed immunostaining for Hcrt (7% of all retrogradely-labeled cells). These cells were distributed bilaterally throughout the PEF, LHA and lateral DMH (18.6 ± 2.8 ipsilateral and 18.7 ± 1.2 contralateral to the injection site). Their location is shown in the diagram of Fig. 3.1A (red stars). These cells were part of the first population described; they were intermingled with other single-labeled CTb⁺ cells (represented by black triangles) and with single-labeled Hcrt⁺ cells (represented by blue circles). Fig. 3.1B and 3.1C are microphotographs of a single section that was processed both for the immunofluorescent detection of Hcrt (Fig. 3.1B) and for the detection of CTb by the DAB method (Fig. 3.1C). When observed with epifluorescence microscopy (Fig. 3.1B), two Hcrt immunopositive cells are recognized. Only one CTb

immunoreactive cell is present under bright field microscopy (Fig. 3.1C). When both images are superimposed (Fig. 3.1D), a single double-labeled neuron is evident (double arrows). It should be noted that in Fig. 3.1D, the single-labeled Hcrt⁺ neuron is still visible (yellow arrowhead).

Because some hypocretinerig/orexinergic neurons also use glutamate as a neurotransmitter (Abrahamson et al., 2001), we compared the number of CTb⁺/Glut⁺ neurons with CTb⁺/Hcrt⁺ neurons. For this analysis, sections from two different guinea-pigs, with virtually identical injection sites in the mV, were examined. The number of CTb⁺/Glut⁺ neurons was significantly larger than the number of CTb⁺/Hcrt⁺ neurons (Student *t*-test; $P < 0.01$), which indicates that many glutamatergic premotor neurons were not hypocretinerig/orexinergic.

MCHergic neurons

A total of 28.1 ± 3.2 CTb⁺/MCH⁺ neurons were observed; their population accounts for approximately 5% of the entire CTb⁺ population; they were located within the LHA and the PEF ipsilateral (13.4 ± 2.8) as well as contralateral (14.6 ± 3.2) to the injection site. In the example presented in Fig. 3.2A, the green stars represent CTb⁺/MCH⁺ neurons, the black triangles single-labeled CTb⁺ cells, and the red circles correspond to single-labeled MCH⁺ neurons. In Fig. 3.2B, two neurons that display red fluorescence, corresponding to MCH-labeling, are shown. The same field, with CTb immunofluorescence in green, shows two labeled neurons (Fig. 3.2C). When the photomicrographs were superimposed, a double-labeled MCHergic premotor neuron was evident (Fig. 3.2D, double arrows). It is important to note that the single-labeled CTb⁺ neuron (yellow short arrow) and the single-labeled MCH⁺ neuron (blue short arrow) were still visible after the superimposition.

Nitregic neurons

A different population of 14.1 ± 3.1 neurons, representing approximately 3% of the total number of CTb⁺ cells, displayed double-labeling for CTb⁺/NADPH-d⁺ or CTb⁺/nNOS⁺; they were distributed exclusively ipsilaterally in the periventricular DMH. Fig. 4A consists of a diagram of the location of nitregic premotor neurons (orange stars), which were intermingled with both single-labeled CTb⁺ (black triangles) and single-labeled NADPH-d⁺ (blue circles) neurons. Double-stained NADPH-d⁺/CTb⁺ cells displayed a brown precipitate in their cytoplasm (Fig. 4B double red arrowhead), making them easily distinguishable from single-labeled NADPH-d⁺ (Fig. 4B single red arrow).

Fluorescent immunostaining for nNOS, combined with CTb labeling, confirmed the distribution of nitregic premotor neurons. Fig. 4C is a photomicrograph of the periventricular DMH processed for nNOS detection as seen under epifluorescence. The same section processed for CTb and photographed with bright field microscopy is shown in Fig. 4D. A double-labeled nNOS⁺/CTb⁺ neuron is indicated by double arrows, while the single yellow arrowhead (Fig. 4C) points to a single-labeled nNOS⁺ neuron; note that this cell is not immunoreactive for CTb (Fig. 4D). These nitregic

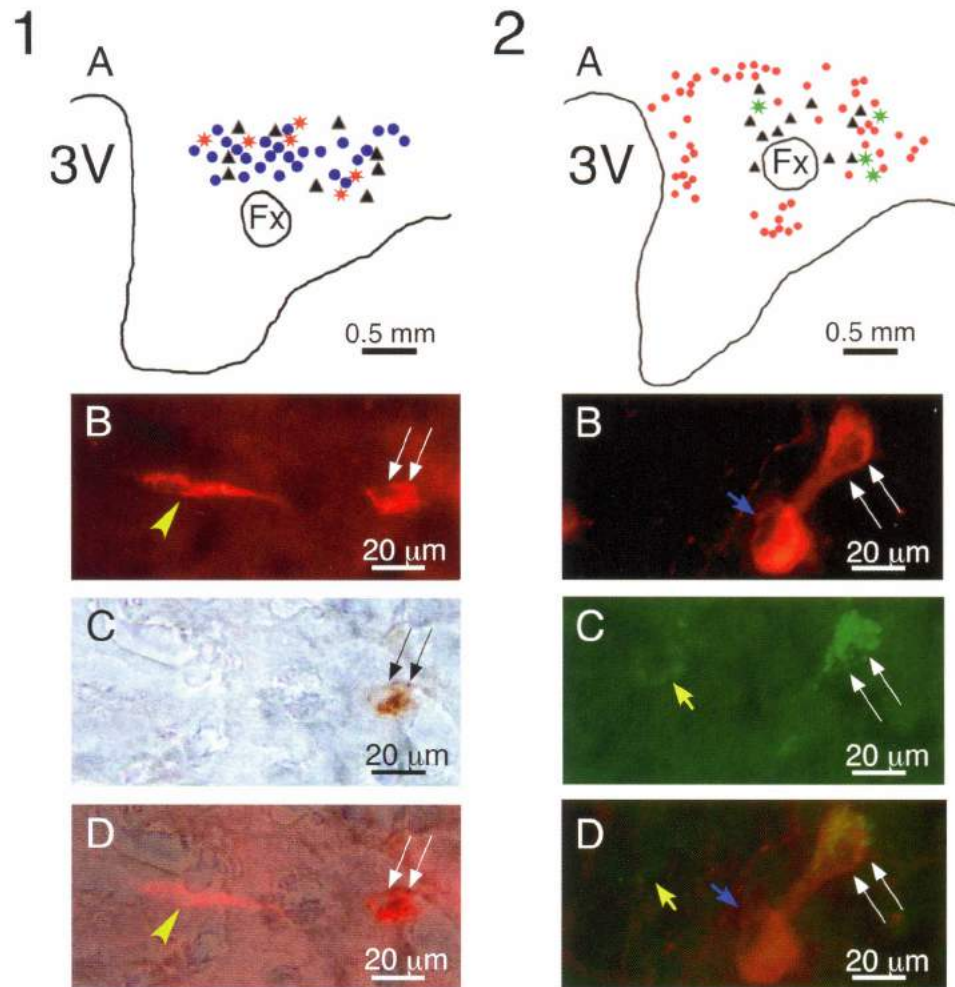


Fig. 3. (3.1) Distribution of hypocretinergic premotor neurons in the hypothalamus. (A) Diagram of a coronal section of the hypothalamus processed for Hcrt and CTb. Red stars indicate double-labeled CTb⁺/Hcrt⁺ neurons; black triangles correspond to CTb⁺ neurons; blue circles represent hypocretinergic/orexinergic neurons. (B, C) Photomicrographs of the same hypothalamic region in a section processed for Hcrt B and CTb. (B) Example of two hypocretinergic/orexinergic neurons (yellow arrow and white double arrows). (C) CTb positive neuron (black double arrows). (D) Superimposition of B and C evidencing double-labeled CTb⁺/Hcrt B⁺ neuron (white double arrows). Fx, fornix; 3V, third ventricle. (3.2) Distribution of MCHergic premotor neurons in the hypothalamus. (A) Diagram of a section of the hypothalamus immunostained for MCH and CTb. Green stars indicate double-labeled CTb⁺/MCH⁺ neurons; black triangles correspond to CTb⁺ neurons; red circles represent MCHergic neurons. (B, C) Photomicrographs of double immunofluorescent labeling for MCH (B, blue arrow and white double arrows) and CTb (C, yellow arrow and white double arrows) of one hypothalamic section in the LHA. (D) Superimposition of B and C showing colocalization of CTb and MCH in one neuron (D, white double arrows).

premotor neurons were part of a larger population of nitroergic cells that were located in the periventricular and medial zones of the DMH, ventro medial hypothalamus, PEF and LHA (see Fig. 4A).

Intermingled with these nitroergic neurons was a cluster of TH⁺ cells. In spite of their similar location, neither NADPH-d⁺/TH⁺ nor CTb⁺/TH⁺ double-labeled neurons were observed.

Neither GABAergic, cholinergic or monoaminergic neurons were found to project directly to the mV from the hypothalamus.

DISCUSSION

In the present study we describe two distinct populations of hypothalamic neurons that project directly to the mV. One population was located in the PEF, the LHA and the

lateral DMH (see Fig. 1.2 A); this population contained glutamatergic, hypocretinergic/orexinergic and MCHergic immunopositive neurons. The second group was located in the periventricular portion of the DMH (see Fig. 1.2 B) and contained glutamatergic and nitroergic neurons. Based upon the presence of hypocretinergic/orexinergic fibers and terminals in the trigeminal and hypoglossal motor nuclei (Fung et al., 2001), and our preliminary data demonstrating the hypothalamic innervation of the hypoglossal motor nucleus (McGregor et al., 2004), it is probable that the preceding two regions of the hypothalamus also project to other brainstem motor pools as well. Interestingly, Arita et al. (1995) demonstrated a direct connection between the LHA and motoneurons that innervate the cricothyroid musculature in the larynx. This organ participates in vocalization

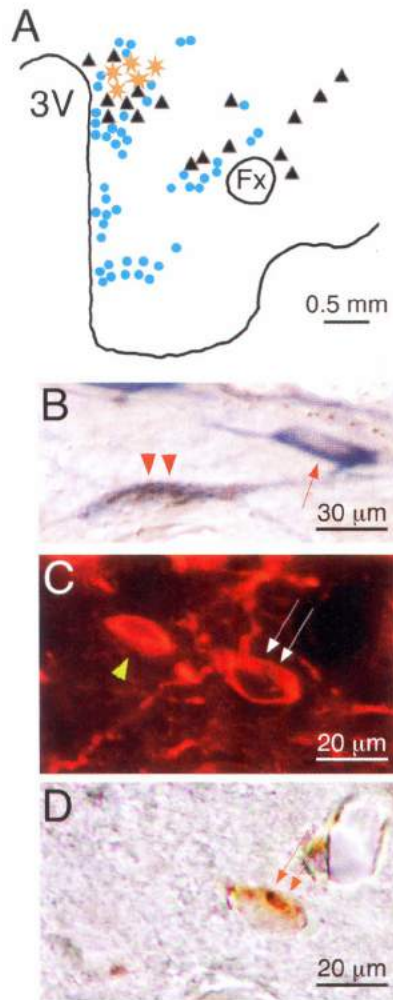


Fig. 4. Distribution of nitergic premotor neurons in the hypothalamus. (A) Diagram of a coronal section of the hypothalamus processed to localize nitergic premotor neurons. Orange stars represent nitergic premotor neurons; black triangles correspond to CTb⁺ neurons; blue circles show NO containing neurons. (B) Photomicrograph of hypothalamic section processed for CTb and NADPH-d in the region of the DMH. Double-labeled CTb⁺/NADPH-d⁺ neuron (double red arrowheads) as well as a single NADPH-d⁺ neuron (red arrow) can be seen. (C, D) Photomicrographs of the same hypothalamic section in the periventricular DMH processed for CTb and nNOS. A double-labeled neuron can be seen in the field (C, white double arrows; D, orange double arrows) as well as a single-labeled nNOS cell (C, yellow arrowhead). Double-labeled cells CTb⁺/nNOS⁺ were found in the same location as the CTb⁺/NADPH-d⁺. Fx, fornix; 3V, third ventricle.

and in respiratory activities that may be modulated during hypothalamically-induced behaviors.

The present data reveal a clear ipsilateral dominance in the distribution of hypothalamic premotor neurons. However, when analyzing the distribution of double-labeled Hcrt⁺/CTb⁺ (see Fig. 3.1) and MCH⁺/CTb⁺ (see Fig. 3.2) neurons, it is interesting to note that the number of ipsilateral and contralateral premotor neurons is comparable. These data suggest that the control exerted by these hypothalamic neuropeptide systems is symmetrically directed to both motor pools.

Methodological considerations

There are a number of possible explanations for the fact that the neurotransmitter of a large number of retrogradely-labeled cells remained unidentified. For example, some glutamatergic neurons exhibit lower levels of glutamate-like immunoreactivity in their cell bodies compared with their terminals (Storm-Mathisen and Ottersen, 1990; Quaglino et al., 1999). Therefore, it is possible that the concentration of glutamate-conjugated protein in the soma of some CTb⁺ cells was below its detection level. The fact that many putative glutamatergic cells are not labeled by conventional immunohistochemical techniques is a recognized drawback of this methodology. However, other groups of hypothalamic neurons, including CTb-labeled neurons, displayed glutamate-like immunoreactivity, which indicates that in these neurons the immunocytochemical techniques that were employed appropriately labeled glutamatergic cells. In addition, numerous synaptic terminals throughout the hypothalamus and the brainstem were also labeled. A second alternative, commonly raised in work of this nature, is the possible existence of a yet unidentified amino acidic neurotransmitter (such as aspartate) that may be used by neurons as a related excitatory neurotransmitter (Dingledine, 1999; Sims and Robinson, 1999).

In the present work we did not observe GABAergic neurons in either of the two regions in which premotor CTb⁺ cells were located. However, in colchicine-treated animals, Okamura et al. (1990) reported the existence of small-sized neurons containing GAD in the DMH and perifornical areas. It is known that colchicine injections are needed to reveal GAD-like immunoreactivity because this substance blocks axonal transport, which allows the cell body to accumulate GAD in sufficient amounts to be detected. In this study, we preferred not to interfere with the axonal transport of the retrograde CTb label. This notwithstanding, it is possible that the small-sized neurons observed in the present work in the hypothalamic regions that we describe as containing premotor structures neurons were GABAergic interneurons (see Fig. 1.3).

Putative synaptic actions of the hypothalamic innervation of trigeminal motoneurons

In the present study, we describe a glutamatergic input from the hypothalamus to the mV (see Fig. 2). In addition, we provide evidence that the hypothalamus may influence the motor nucleus of the trigeminal complex through the production of at least three other substances: Hcrt, MCH and NO.

Peever et al. (2003) have presented pharmacological evidence indicating an indirect excitatory effect of hypocretins/orexins on trigeminal motoneurons by means of the presynaptic release of glutamate. Yamuy et al. (2004) have shown that Hcrt acts as an excitatory neuromodulator directly, as well as indirectly, on motoneurons to promote their discharge. For most other types of neurons, hypocretins/orexin acts pre- and postsynaptically as an excitatory neuromodulator (Sutcliffe and de Lecea, 2002).

Although motoneurons express mRNA for MCH receptors (Saito et al., 2001), there are no published studies that have assessed the actions of MCH on somatic motoneurons. In culture and tissue slices of lateral hypothalamic neurons, MCH has been shown to inhibit the release of both glutamate and GABA (Gao and van den Pol, 2001); a presynaptic effect that is the opposite to that of Hcrt. In lateral hypothalamic neurons, MCH also exerts inhibitory effects via Ca^{++} currents (Gao and van den Pol, 2001). Thus, it has been postulated that MCH and Hcrt act antagonistically with respect to their target cells (Modirrousta et al., 2005). Consequently, it is possible that MCH serves as an inhibitory neuromodulator that opposes the actions of hypocretins/orexins in motoneuron pools.

Nitric oxide (NO) acts as a neuromodulator, principally by increasing the levels of cyclic guanosine 3,5'-monophosphate (cGMP). We have shown that NO administration results in motoneuron depolarization and an increase in the generation of action potentials in trigeminal motoneurons (Abudara et al., 2002). One source of premotor nitergic projections emanates from the magnocellular and gigantocellular reticular formation of the brainstem (Pose et al., 2005). The present study describes an additional source of nitergic innervation, i.e. cell bodies located in the DMH (see Fig. 4).

Behavioral implications of the existence of premotor regions in the hypothalamus

The hypothalamus is involved in diverse and complex behaviors involving sleep, fear, motivation, feeding, reproduction, etc. (Swanson, 1987; Bernardis and Bellinger, 1996; Hillebrand et al., 2002). The premotor neurons that we describe are involved in the control of the oral musculature which plays a key role in most, if not all, of the preceding behaviors. The total number (approximately 530) of premotor neurons in the hypothalamus that innervate the mV is comparable to those present in other premotor structures; for example, in the same animals, the medial medullary reticular formation contained approximately 680 neurons (Fabbiani et al., unpublished observations), which suggests that the hypothalamic motor output is at least as important in the execution of motor acts as is the medial medullary reticular formation.

The diversity of neurotransmitters/neuromodulators present in premotor neurons in hypothalamic structures raises the question of whether they serve the same functions or behaviors, acting synergistically in the attainment of certain motor acts, or alternatively, whether different types of neurons are specifically activated during different motor behaviors. In this regard, it should be noted that we identified two anatomically differentiated motor regions in the hypothalamus, one occupying mainly the lateral hypothalamus and the other that was located more medially in the periventricular portion of the DMH. Traditionally, the lateral hypothalamus has been shown to be involved with emotional/motivated behaviors, whereas the dorsomedial hypothalamus has been implicated in mediating escape behaviors such as fear (Bernardis and Bellinger, 1998); it is therefore likely that these two regions control different motor acts.

However, these two regions are also interconnected (Bernardis and Bellinger, 1998), which makes it likely that even though they may mediate different motor acts in the context of different behavioral situations, their output nevertheless is integrated and coordinated.

Acknowledgments—We are grateful to J. K. Engelhardt for his critical review of this manuscript and to Silvia Bouvier and Sharon Sampogna for their technical assistance. This work was supported by the following grants from the U.S. Public Health Service: NS23426, NS09999, MH43362, MH69372 and AG04307.

REFERENCES

- Abrahamson EE, Leak RK, Moore RY (2001) The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 12:435–440.
- Abudara V, Alvarez AF, Chase MH, Morales FR (2002) Nitric oxide as an anterograde neurotransmitter in the trigeminal motor pool. *J Neurophysiol* 88:497–506.
- Achari NK, Thexton AJ (1972) Diencephalic influences on the jaw opening reflex in the cat. *Arch Oral Biol* 17:1073–1080.
- Arita H, Kita I, Sakamoto M (1995) Two distinct descending inputs to the cricothyroid motoneuron in the medulla originating from the amygdala and the lateral hypothalamic area. *Adv Exp Med Biol* 393:53–58.
- Bernardis LL, Bellinger LL (1996) The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 20:189–287.
- Bernardis LL, Bellinger LL (1998) The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. *Proc Soc Exp Biol Med* 218:284–306.
- Card JP, Swanson WL, Moore RY (1999) The hypothalamus: an overview of regulatory systems. In: *Fundamental neuroscience* (Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, Zigmond MJ, eds), pp 1013–1026. San Diego: Academic Press.
- Coggeshall RE (1992) A consideration of neural counting methods. *Trends Neurosci* 15:9–13.
- Coggeshall RE, Lekan HA (1996) Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *J Comp Neurol* 364:6–15.
- Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH (1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7797–7801.
- Dingledine RMC (1999) Glutamate and aspartate. In: *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects* (Siegel GJ, Agranoff BW, Fisher SK, Wayne Albers R, Uhler MD, eds), pp. 315–333. New York: Lippincott-Raven.
- Fung SJ, Yamuy J, Sampogna S, Morales FR, Chase MH (2001) Hypocretin (orexin) input to trigeminal and hypoglossal motoneurons in the cat: a double-labeling immunohistochemical study. *Brain Res* 903:257–262.
- Gao XB, van den Pol AN (2001) Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *J Physiol* 533:237–252.
- Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RA (2002) Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23:2283–2306.
- Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR (1991) Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2811–2814.
- Hosoya Y, Matsushita M (1981) Brainstem projections from the lateral hypothalamic area in the rat, as studied with autoradiography. *Neurosci Lett* 24:111–116.
- Inoue M, Nozawa-Inoue K, Miyaoka Y, Yamada Y (2001) Changes in jaw reflexes by stimulation of the hypothalamus in anesthetized rabbits. *Neurosci Res* 41:61–65.

- McGregor RJ, Damián A, Fabbiani G, Torterolo P, Morales FR, Chase MH (2004) Hypothalamic innervation of the trigeminal and hypoglossal motor nuclei: A retrograde tracer study. Program No 755.5, 2004 Abstract viewer/Itinerary planner. San Diego, Society for Neuroscience CD-ROM.
- Modirrousta M, Mainville L, Jones BE (2005) Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *Eur J Neurosci* 21:2807–2816.
- Morales FR, Sampogna S, Yamuy J, Chase MH (1999) c-Fos expression in brainstem premotor interneurons during cholinergically induced active sleep in the cat. *J Neurosci* 19:9508–9518.
- Okamura H, Abitbol M, Julien JF, Dumas S, Berod A, Geffard M, Kitahama K, Bobillier P, Mallet J, Wiklund L (1990) Neurons containing messenger RNA encoding glutamate decarboxylase in rat hypothalamus demonstrated by in situ hybridization, with special emphasis on cell groups in medial preoptic area, anterior hypothalamic area and dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience* 39:675–699.
- Peever JH, Lai YY, Siegel JM (2003) Excitatory effects of hypocretin-1 (orexin-A) in the trigeminal motor nucleus are reversed by NMDA antagonism. *J Neurophysiol* 89:2591–2600.
- Pose I, Fung S, Sampogna S, Chase MH, Morales FR (2005) Nitroergic innervation of trigeminal and hypoglossal motoneurons in the cat. *Brain Res* 1041:29–37.
- Quaglino E, Giustetto M, Panzanelli P, Cantino D, Fasolo A, Sasso-Pognetto M (1999) Immunocytochemical localization of glutamate and gamma-aminobutyric acid in the accessory olfactory bulb of the rat. *J Comp Neurol* 408:61–72.
- Rapisarda C, Bacchelli B (1977) The brain of the guinea pig in stereotaxic coordinates. *Arch Sci Biol (Bologna)* 61:1–37.
- Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL (2000) Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev* 80:767–852.
- Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O (2001) Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol* 435:26–40.
- Saper CB (1996) Any way you cut it: a new journal policy for the use of unbiased counting methods. *J Comp Neurol* 364:5.
- Simerly RB (1995) Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: *The rat nervous system* (Paxinos G, ed), pp 353–376. San Diego: Academic Press.
- Sims KD, Robinson MB (1999) Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 13:169–197.
- Storm-Mathisen J, Ottersen OP (1990) Immunocytochemistry of glutamate at the synaptic level. *J Histochem Cytochem* 38:1733–1743.
- Sutcliffe JG, de Lecea L (2002) The hypocretins: setting the arousal threshold. *Nat Rev Neurosci* 3:339–349.
- Swanson LW (1987) *The hypothalamus*. Elsevier: Amsterdam.
- van den Pol AN (1999) Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci* 19:3171–3182.
- Yamuy J, Fung SJ, Xi M, Chase MH (2004) Hypocretinergic control of spinal cord motoneurons. *J Neurosci* 24:5336–5345.
- Zhang J, Luo P (2002) Orexin B immunoreactive fibers and terminals innervate the sensory and motor neurons of jaw-elevator muscles in the rat. *Synapse* 44:106–110.
- Zhang J, Sampogna S, Morales F, Chase M (2002) Co-localization of hypocretin-1 and hypocretin-2 in the cat hypothalamus and brainstem. *Peptides* 23:1479.

(Accepted 1 August 2005)
(Available online 14 October 2005)

