



*Universidad de Salamanca
Facultad de Medicina
Departamento de Biología
Celular Patología*



*Instituto de Neurociencias de
Castilla y León (INCYL)
Laboratorio de Neuroanatomía
de los Sistemas Peptidérgicos*

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**“DISTRIBUCIÓN DE NEUROPEPTIDOS EN
EL DIENCÉFALO DE LA ALPACA (*Lama
pacos*): ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO”**

LUIS ENRIQUE MEDINA MEDINA

Salamanca, Mayo 2009



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y

PATOLOGÍA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE

CASTILLA Y LEÓN (INCYL)

“DISTRIBUCIÓN DE NEUROPEPTIDOS EN EL

DIENCÉFALO DE LA ALPACA (*Lama pacos*):

ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO”

Memoria presentada por D. Luís Enrique Medina Medina para optar

al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Directores: Dr. Rafael Coveñas Rodríguez

Dr. Miguel Merchán Cifuentes

Salamanca, Mayo 2009

Miguel Merchán Cifuentes, Catedrático de Histología de la Universidad de Salamanca y Director del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL) y Rafael Coveñas Rodríguez, Profesor Titular de Biología Celular de la Universidad de Salamanca y miembro del INCYL

CERTIFICAN que:

El trabajo titulado: “DISTRIBUCIÓN DE NEUROPEPTIDOS EN EL DIENCÉFALO DE LA ALPACA (*Lama pacos*): ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO” ha sido realizado por D. Luís Enrique Medina Medina, en el Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL), bajo nuestra dirección, y en nuestra opinión reúne los requisitos necesarios para ser defendido y optar el Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste lo firmamos en Salamanca a 20 de Mayo de 2009

Fdo. Miguel Merchán Cifuentes

Rafael Coveñas Rodríguez

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	8
1.1. GENERALIDADES DE LA ESPECIE (LAMA PACOS)	9
1.1.1 Hábitat	9
1.1.2 Anatomía.....	10
1.1.3 Conducta.....	10
1.1.4 Fibra de Alpaca	11
1.1.5 Razas de alpaca	12
1.1.6 Alimentación	12
1.1.7 Reproducción	13
1.2. DIENCÉFALO.....	13
1.2.1 Epitálamo.....	13
1.2.2. Tálamo	14
1.2.3 Metatálamo	14
1.2.4 Hipotálamo	15
1.2.5 Subtálamo	15
1.3. NEUROPEPTIDOS	15
1.3.1 Concepto.....	15
1.3.2 Péptido, polipéptido y proteína.....	16
1.3.3 Las neuronas pueden captar péptidos del medio extracelular.....	16
Un neuropéptido puede actuar como neurotransmisor, neuromodulador y neurohormona.....	16
Los neuropéptidos pueden ejercer una acción retrógrada	17
1.3.6 Los neuromoduladores controlan la liberación de los neurotransmisores.....	18
1.3.7 Familias de neuropéptidos.....	18
1.3.11 Liberación de los neuropéptidos.....	25
1.3.12 Receptores de neuropéptidos	25
1.3.13 Peptidasas.....	26
1.6 NEUROTENSINA.....	35
1.7 SOMATOSTATINA.....	37
II. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y	42
APLICACIONES FUTURAS.....	42
2.1. JUSTIFICACIÓN	43
2.2. OBJETIVOS	44
2.3. APLICACIONES FUTURAS	45
III. MATERIAL Y MÉTODOS	47
3.1. ANIMALES Y PERFUSIÓN	48
3.2. INMUNOCITOQUÍMICA.....	48
3.3. OBTENCIÓN Y ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS.....	49
3.4. CARTOGRAFÍA	51
3.5. DENSIDADES DE LAS FIBRAS Y DE LOS SOMAS INMUNORREACTIVOS.....	51
IV. RESULTADOS	53
4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES	59
4.2. DISTRIBUCIÓN DE CGRP EN EL DIENCÉFALO DE LA ALPACA	66
4.3. DISTRIBUCIÓN DE LEUCINA-ENCEFALINA EN EL DIENCÉFALO DE LA ALPACA.....	73
4.5. DISTRIBUCIÓN DE NEUROTENSINA EN EL DIENCÉFALO DE LA ALPACA.....	86
V. DISCUSION	99
5.1 DISTRIBUCIÓN DE LOS NEUROPEPTIDOS ESTUDIADOS EN EL DIENCÉFALO DE LA ALPACA	100

5.1.1. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP).....	100
5.1.2. Leucina-encefalina.....	101
5.1.3. Somatostatina.....	101
5.1.4. Neurotensina.....	102
5.2. RELACIÓN ANATÓMICA ENTRE LOS CINCO NEUROPEPTIDOS ESTUDIADOS EN EL DIENCEFALO DE LA ALPACA.....	103
5.3.1. CGRP.....	104
5.3.2. Leucina-encefalina.....	106
5.3.3. Somatostatina.....	108
5.3.4. Neurotensina.....	110
5.3.5. Hormona adrenocorticotrópica (ACTH)	112
VI. CONCLUSIONES.....	118
VII. BIBLIOGRAFIA	120

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento oportuno a los profesores Luis Ángel Aguilar y Pedro Yi (*in memoriam*) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Peruana (UPCH-Lima, Perú) quienes donaron los diencéfalos de *Lama pacos*.

Al profesor Gérard Tramu, de la Universidad de Burdeos I, quien donó los anticuerpos primarios, para la realización de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud del Perú, por haberme permitido seguir mis estudios de doctorado en la Universidad de Salamanca

Al Banco Santander Central Hispano por su vocación de futuro en materia de Responsabilidad Social Corporativa mediante una voluntad de liderazgo, por concederme la beca desde el año 2006 al 2009, la cual le permite mantener una alianza estratégica y estable con el mundo universitario en Latinoamérica.

Así mismo el agradecimiento al Dr. Rafael Coveñas Rodríguez, por su constante enseñanza y guía en la culminación de este trabajo, mas que un amigo, un maestro digno de seguir su ejemplo.

Al Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL), a su director Dr. Miguel Merchán Cifuentes, por haberme dado un punto de apoyo y seguir por la senda científica del campo neurocientífico.

Al Dr. Arturo Mangas Martín, quien con un profesionalismo impecable me guió en el desarrollo de las técnicas experimentales de inmunocitoquímica y desarrollo de las técnicas de diseño fotográfico de las mismas.

Al Dr. Pedro Álvarez Falconí, ex Director del Centro Nacional de Control de Calidad (CNCC)-INS-Perú, por haberme dado el apoyo incondicional para seguir mis estudios de doctorado en la Universidad de Salamanca.

Agradecemos la Colaboración oportuna y valedera de D. Ewing Rafael Duque Díaz, por su apoyo en la ejecución de las técnicas cartográficas.

Así mismo a todo el personal académico y técnico y también de servicio que con un grano de arena día a día contribuyen a crear grandes obras y cristalizar los objetivos propuestos en este trabajo

Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia/Ministerio de Ciencia e Innovación (BFI2001-1905, BFU2005-02241/BFI y BFU2008-03369/BFI) y CONCYTEC (Perú).

I. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES DE LA ESPECIE (*Lama pacos*)

La alpaca se denominaba anteriormente *Auchenia pacus*, pero actualmente se conoce como *Lama pacos*. La alpaca es un camélido sudamericano que está estrechamente emparentado con la llama y la vicuña. La alpaca es más pequeña que la llama, su lana es más larga y suave y no se suele usar como bestia de carga. El hábito de escupir (el animal muestra agresividad o lo utiliza como método de defensa) es común en la alpaca y en la llama (aunque una alpaca bien domesticada no suele escupir). La fibra de lana de alpaca es elástica, fuerte y más recta y sedosa que la de la oveja. Aunque la carne de alpaca es comestible, el animal se utiliza sobre todo por su lana, de la cual se fabrican prendas de vestir de gran calidad (ver de Souza, 2007a).



Alpaca (*Lama pacos*)

1.1.1 Hábitat

Las alpacas se encuentran desde el norte del Perú hasta el norte de Argentina, incluyendo las respectivas áreas alto andinas de Bolivia, Ecuador y Chile. En general, el medio en el que habitan es más húmedo en dirección norte y más seco hacia el sur. Los camélidos pueden habitar desde el nivel del mar hasta las regiones alto andinas, a más de 5.000 m de altitud.

1.1.2 Anatomía

La alpaca es más pequeña que la llama y en la frente presenta un típico mechón. No posee un color característico, ya que presenta muchas tonalidades. Puede alcanzar hasta una altura de 1,50 m y un peso máximo de 80 kg. En general, posee más y mejor lana que la llama. La longevidad de la alpaca es alta (14 años de vida media), aunque algunos animales han alcanzado los 20 años. Debido a la anatomía de sus miembros, son animales que no generan daño mecánico a los suelos, aún en zonas áridas, ya que estos animales se han adaptado perfectamente a medios áridos y ecológicamente frágiles. Así, por ejemplo, presentan labio leporino (labio hendido) que le confiere una gran ventaja pues les permite comer hierba con gran eficacia. Son animales que pueden criarse consumiendo forraje de baja calidad y digestibilidad, en donde otros rumiantes tendrían serias dificultades para sobrevivir. Además, los requerimientos nutricionales de la alpaca son sensiblemente menores a los que presentan otros rumiantes de similar tamaño. Otra particularidad de la alpaca son los incisivos que se ubican oblicuamente y tienen un crecimiento continuo, semejante al de los roedores. Por esta cualidad son muy longevos, pues les permite seguir cosechando forraje eficientemente a pesar del paso de los años. Finalmente, indicar que la alpaca es un herbívoro muy eficaz en convertir el forraje que ingiere en carne. Algunos trabajos de investigación han demostrado que es hasta un 58% más eficaz que los ovinos en transformar el alimento en peso (ver de Souza, 2007a).

1.1.3 Conducta

Las alpacas son animales sociales que viven formando rebaños que generalmente están compuestos por un macho dominante (alcanza la madurez sexual aproximadamente a los 4-5 años de edad) y varias hembras acompañadas de sus crías; el

resto de los machos forman otro rebaño. Las alpacas hembras presentan una jerarquía dentro del rebaño, ya que hay una hembra dominante. El macho intenta mantener alejados a los depredadores de su territorio y cuando un joven macho del rebaño llega a tener alrededor de ocho meses de edad, lo alejará fuera del rebaño (de esta forma se previene la endogamia). Es frecuente observar a los machos peleando durante la época de celo, cuando alguno intenta ocupar el puesto dominante del otro. En general, las alpacas son muy mansas, incluso los machos no son peligrosos. Son animales capaces de defenderse de los ataques de los perros salvajes y de los zorros. Por esta razón, se utilizan en ocasiones como protectores de rebaños de ovejas. Las alpacas se comunican entre sí mediante movimientos de su cuerpo y gracias a distintos tipos de sonidos con diferentes tonos. Las alpacas tienen una memoria excelente. Pueden aprender una tarea en 2-5 repeticiones y lo recordarán para siempre, aún cuando no se las vuelva a reforzar (ver de Souza, 2007a).

1.1.4 Fibra de Alpaca

El vellón de la alpaca es uno de los productos del animal más apreciado en el mercado. Está constituido por fibras finas y gruesas: las finas se encuentran en la parte del lomo y los flancos del animal, mientras que las gruesas se concentran principalmente en la región pectoral, extremidades y cara. El diámetro de la fibra de alpaca oscila entre 18 y 33 micras, dependiendo de la parte del cuerpo y de la edad del animal. La resistencia de la fibra es muy importante en los procedimientos textiles: la de la alpaca es tres veces mayor que la resistencia que presenta la de la oveja (Villarroel, 1981).

La fibra de alpaca es suave al tacto y tiene un alto poder de higroscopicidad, que le permite absorber la humedad ambiental entre un 10%-15%, no afectando a su aspecto. Otra característica importante de la fibra de alpaca es la capacidad de mantener la

temperatura corporal. En cuanto al color de la fibra, es posible encontrar más de 16 colores diferentes que varían desde el blanco hasta el negro, pasando por las tonalidades cremas y tonos marrones, plateados y grises. Finalmente, indicar que en los procedimientos textiles, la fibra de alpaca tiende a separarse y precisa que se combine con otras fibras naturales o sintéticas que ejercen el efecto contrario (ver de Souza, 2007a).

1.1.5 Razas de alpaca

La alpaca presenta dos razas: la huacaya y la suri que se diferencian por su fibra. La fibra de la huacaya es opaca, rizada y esponjosa, parecida a la lana de oveja, mientras que la fibra de la suri es lacia, sedosa, lustrosa y brillante, parecida a la suavidad del cashmere y al lustre y brillo de la seda. Las alpacas blancas (raza huacaya) abundan en la región sur de los Andes. La industria textil prefiere la fibra blanca como materia prima para ser procesada industrialmente (la fibra blanca es teñida con tintes sintéticos). Desde la perspectiva de la conservación de la diversidad biológica en los Andes, esta situación está ocasionando la pérdida de las alpacas de la raza suri, que se encuentra en franco proceso de extinción, afectando al futuro de esta especie animal y a la subsistencia de los grupos humanos ligados a su crianza en los Andes (ver de Souza, 2007a, b).

1.1.6 Alimentación

Las alpacas son herbívoros rumiantes que se pueden alimentar de los pastos que crecen en las zonas húmedas (o bojedales) ubicados por encima de los 4.000 m de altitud. La dieta forrajera es poco selectiva y pueden pastorear y ramonear todo tipo de vegetación. Pueden consumir forrajes de baja calidad y digestibilidad gracias a su eficiente aparato digestivo muy superior al que presentan otros rumiantes, los cuales

tendrían serias dificultades en digerir dichos pastos. El consumo medio de un macho adulto es de aproximadamente 1,5-2 kg de materia seca; en el caso de alpacas hembras (durante el último tercio de la gestación, durante el inicio de lactancia) necesitan ingerir hasta 3 kg de materia seca (ver de Souza et al., 2007a, b).

1.1.7 Reproducción

El periodo de gestación de una alpaca es aproximadamente de once meses y medio, al cabo de los cuales da a luz a una cría (en raras ocasiones a dos) de aproximadamente 7 kg. Los machos emiten un sonido denominado “orgling” durante el apareamiento que puede durar desde 15 minutos a una hora. Se sabe que 24-36 horas después del apareamiento, se produce la ovulación. Después de 2-3 semanas la hembra puede quedar de nuevo preñada. Se estima que la población mundial de alpacas llega a los 3,5 millones de cabezas, siendo Perú, el principal productor con aproximadamente el 87%, seguido por Bolivia con el 9.5%. Los principales departamentos productores del Perú son: Puno (58,5%), Cusco (11,4%), Arequipa (9,4%), Huancavelica (6,8%) y Ayacucho (4,6%).

1.2. DIENCÉFALO

El diencéfalo se encuentra localizado entre el telencéfalo y el tronco del encéfalo. Se extiende rostralmente desde la comisura posterior hasta la región del agujero interventricular. Esta limitado a ambos lados por el segmento posterior de la capsula interna, la cola del nucleo caudado y la estría terminal. A través del diencéfalo pasan la mayoría de fibras que se dirigen hacia la corteza cerebral. El diencéfalo se divide en epitálamo, tálamo, hipotálamo, metatálamo y subtálamo (Carpenter, 1980).

1.2.1 Epitálamo. Está formado por los núcleos de la habénula medial y lateral y por el núcleo pariventricular anterior. Los núcleos habenuares son dos pequeñas masas grises

que forman eminencias triangulares sobre la superficie dorsomedial de los tálamos. Reciben fibras principalmente de la región preóptica a través de las estrías medulares. Los axones procedentes de los núcleos habenules forman un haz bien definido, el fascículo retroflexo, que termina en los núcleos interpedunculares (Carpenter, 1980).

1.2.2. Tálamo. El tercer ventrículo separa el tálamo derecho del izquierdo, aunque éstos permanecen unidos gracias a un puente de tejido talámico denominado masa intermedia, que se extiende entre ambos. El tálamo es una masa de sustancia gris, por lo que contienen cuerpos neuronales y numerosas conexiones sinápticas. Es una zona de relevo entre la médula espinal/tronco del encéfalo y la corteza cerebral/ganglios basales. Desde un punto de vista funcional, el tálamo es una estación de relevo sensitivo. Los impulsos nerviosos hacen escala a nivel talámico, estableciendo sinapsis antes de proseguir su recorrido hacia la corteza cerebral. Al tálamo llega la información somatosensorial, nociceptiva, visual, auditiva, gustativa y olfativa. Además, interviene en mecanismos motores y en el lenguaje. El tálamo presenta asimetría funcional. Cada lado está especializado en una función (un lado predomina sobre el otro). Así, el tálamo del lado izquierdo predomina sobre el derecho en los mecanismos involucrados en el lenguaje y en los procesos mecánicos que tienen que ver con la respiración. Ocurre todo lo contrario con los procesos visuales-espaciales.

1.2.3 Metatálamo. Los cortes transversales anteriores del mesencéfalo revelan el agregado de algunas masas nucleares definidas que contornean estrechamente las caras posterior y lateral del mesencéfalo. Estas estructuras incluyen a los cuerpos geniculados medial y lateral (Carpenter, 1980). Ambos, forman el metatálamo y están involucrados en la información visual y auditiva.

1.2.4 Hipotálamo. Se localiza debajo del tálamo. Presenta una gran variedad de funciones. Por ejemplo, produce neurohormonas (oxitocina, vasopresina) y contiene núcleos que regulan la actividad de la hipófisis anterior, la temperatura corporal y la ingesta de agua y de alimentos. Además, el hipotálamo se relaciona con el estado de vigilia y las emociones. La estimulación del hipotálamo medial inhibe la ingesta de alimentos y regula la termogénesis; mientras que la estimulación del hipotálamo lateral estimula la ingesta de alimentos.

Se sabe que el hipotálamo es una de las zonas mejor conservadas en la escala animal; que recibe información olfativa y visual, así como la sensitiva de las vísceras y que interviene en la homeóstasis (balance de electrolitos), función inmune, ritmos circadianos, presión sanguínea, estrés, reproducción y agresividad. Las lesiones en el hipotálamo pueden originar: anorexia nerviosa, bulimia, depresión, cambios en la orientación sexual, alteraciones en el sueño, alteraciones en la temperatura, el síndrome de Prader-Willi

1.2.5 Subtálamo. Interviene en el control motor. Está atravesado por axones que se dirigen hacia el tálamo y el cerebelo (Carpenter, 1980).

1.3. NEUROPEPTIDOS

1.3.1 Concepto

Un neuropeptido es un péptido (formado por aminoácidos) que es sintetizado en una célula nerviosa (neurona). Aparecen tanto en las neuronas del sistema nervioso central (encéfalo y médula espinal), como en las del sistema nervioso periférico (ganglios espinales, sensitivos y autónomos). Se ha demostrado que hay péptidos en la neuroglía; así, el mismo péptido (somatostatina) que se sintetiza en una neurona (se denomina

entonces neuropéptido) puede ser sintetizado por una célula no nerviosa (por ejemplo, se ha descrito que los astrocitos del cerebelo sintetizan y liberan el péptido somatostatina). Otro ejemplo sería las células “D” de los islotes de Langerhans (páncreas endocrino) que sintetizan y liberan el péptido somatostatina (ver Coveñas et al., 2007a).

1.3.2 Péptido, polipéptido y proteína

Actualmente se utilizan los siguientes términos, según el número de aminoácidos que forman dichas sustancias:

- **Péptido:** constituido por menos de 100 aminoácidos
- **Polipéptido:** entre 100 y 200 aminoácidos
- **Proteína:** más de 200 aminoácidos

1.3.3 Las neuronas pueden captar péptidos del medio extracelular

Aunque parece ser que no es un mecanismo muy generalizado, existen ciertas poblaciones neuronales que tras administrar beta-endorfina en el sistema ventricular captan del medio externo dicho péptido opiáceo y lo transportan retrógradamente hasta el soma neuronal. De esta forma una neurona que no sintetiza en condiciones normales beta-endorfina, sí es capaz de almacenar dicho péptido tras captarlo del espacio extracelular. Es por lo tanto, la excepción a la definición que hemos indicado anteriormente (ver Coveñas et al., 2007a).

Un neuropéptido puede actuar como neurotransmisor, neuromodulador y neurohormona

La liberación de un determinado neuropéptido al espacio extracelular a partir de las vesículas de una neurona peptidérgica, implica que el neuropéptido puede ejercer:

1. Una acción paracrina (actúa como un neuromodulador). El neuropeptido se une a sus receptores que están localizados en el componente postsináptico lejano (dentro del sistema nervioso central), controlando la neurotransmisión (reduciendo la liberación del neurotransmisor) o controlando la actividad neuronal (aumentando la síntesis de neuropeptidos...)
2. Una acción autocrina (neuromoduladora). El neuropeptido se une a sus receptores localizados en el componente presináptico (afectando a la neurotransmisión: reduciendo la liberación del neurotransmisor)
3. Una acción neurotransmisora (se une a sus receptores localizados en el componente postsináptico próximo) (sinapsis química)
4. Una acción muy lejos del lugar en donde se liberó (sangre o líquido cefalorraquídeo) (neurohormona) (actuando sobre fibras musculares)

Un mismo neuropeptido puede actuar como neurotransmisor, neuromodulador o neurohormona (ver Coveñas et al., 2007a).

Los neuropeptidos pueden ejercer una acción retrógrada

Se ha descrito que la administración de neurotensina en el estriado produce la acumulación del péptido en los somas dopaminérgicos del mesencéfalo. La neurotensina es transportada retrógradamente desde el estriado (es captada por las terminaciones axonales) hasta el mesencéfalo (en donde se encuentran los somas neuronales). Además, se ha comprobado que la neurotensina aumenta el número de células que expresan el ARN-m de la enzima tirosina-hidroxilasa, indicando que la neurotensina altera el funcionamiento neuronal (ver Coveñas et al., 2007a).

1.3.6 Los neuromoduladores controlan la liberación de los neurotransmisores

Se sabe que la unión de la metionina-encefalina (neuromodulador) a los receptores opiáceos localizados en la membrana plasmática de las neuronas que contienen sustancia P (neurotransmisor) regula (inhibe) la liberación de este último neuropéptido (ver Coveñas et al., 2007a). Además, la unión de un neuropéptido (ej., neurotensina...) a sus autorreceptores (componente presináptico) controla la liberación y la síntesis de neurotensina por las neuronas neurotensinérgicas que contienen a los autorreceptores para la neurotensina (ver Coveñas et al., 2007a). Es decir, la neurotensina liberada a partir de una neurona neurotensinérgica, controla la síntesis y liberación de neurotensina por esa misma neurona.

Los cannabinoides endógenos pueden también actuar como neuromoduladores, ya que se liberan a partir de la terminación postsináptica y, tras unirse a los receptores CB1 localizados en el componente presináptico, inhiben la liberación de neurotransmisores a partir de la terminación presináptica. Se ha indicado que mediante estos mecanismos los cannabinoides podrían intervenir en la memoria, procesos cognitivos y en la percepción del dolor (ver Coveñas et al., 2007a).

1.3.7 Familias de neuropéptidos

Actualmente, los péptidos se clasifican dependiendo de las semejanzas/diferencias (homología) de las secuencias de aminoácidos que presentan. Aproximadamente, hay unos 600 péptidos descritos. Uno de los péptidos más pequeños que se conoce es la kiotorfina (está formado por dos aminoácidos). Los neuropéptidos se pueden agrupar en las siguientes familias (se indican las familias más estudiadas) (ver Coveñas et al., 2007a):

I. BOMBESINA Y PÉPTIDO LIBERADOR DE GASTRINA

II. COLECISTOQUININA

III. PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA**IV. NEUROPEPTIDO Y****V. NEUROTENSINA****VI. OXITOCINA Y VASOPRESINA****VII. SOMATOSTATINA****VIII. TAQUIQUININAS****IX. POLIPEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO****X. PEPTIDOS OPIÁCEOS****XI. OTROS NEUROPEPTIDOS QUE NO SE INCLUYEN EN LAS
ANTERIORES FAMILIAS**

- Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH)
- Hormona Estimulante de los Melanocitos (alfa)(alfa-MSH)
- Galanina (GAL)
- Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante (LH-RH)
- Factor que Libera a la Corticotropina (CRF)
- Hormona que Libera a la Tirotropina (TRH)

1.3.8 Distribución de los neuropeptidos

Los neuropeptidos generalmente se encuentran ampliamente distribuidos por el sistema nervioso periférico (ganglios sensitivos, simpáticos y parasimpáticos) y por el sistema nervioso central (encéfalo y médula espinal) de mamíferos. Así, por ejemplo, para conocer la distribución y la concentración de los neuropeptidos en los núcleos del sistema nervioso central de la rata (ver Palkovits, 1988), mientras que para conocer la

distribución de los neuropéptidos en el tálamo, hipotálamo y en el tronco del encéfalo del gato, ver las revisiones realizadas por Coveñas et al. (2001, 2002, 2003b, 2007b).

1.3.9 Biosíntesis y procesamiento de los neuropéptidos

La síntesis de los neuropéptidos se realiza de la siguiente forma (ver Coveñas et al., 2007a):

- 1. TRANSCRIPCIÓN.** Síntesis de ARN-mensajero a partir del ADN.
- 2. TRADUCCIÓN.** Una vez que el ARN-m sale del núcleo a través de la envuelta nuclear, tiene lugar la traducción en donde el ARN-m es leído por los ribosomas que están asociados generalmente al retículo endoplasmático (retículo endoplasmático rugoso). La lectura del ARN-m por los ribosomas origina el pre-pro-péptido.
- 3. FORMACIÓN del PRO-PEPTIDO o PRECURSOR.** El pre-pro - péptido es introducido en el interior de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso. Mediante la acción de una endopeptidasa que se localiza en la membrana del retículo y que está orientada hacia la luz de la cisterna, se elimina el péptido señal (“pre”), quedando por lo tanto el pro-péptido o precursor (inactivo). Este proceso puede también ocurrir, aunque es menos frecuente, en el complejo de Golgi.
- 4. PROCESADO POST-TRANSDUCCIONAL.** Tiene lugar en el retículo endoplasmático rugoso, complejo de Golgi y/o en las vesículas que se originan a partir de dicho complejo. Consiste en la eliminación de parte del precursor mediante la acción de peptidasas (proteolisis) y en modificar químicamente al precursor mediante mecanismos de glicosilación, fosforilación y/o sulfatación.

5. MODIFICACIONES QUÍMICAS DE LOS NEUROPEPTIDOS. Ocurre en las vesículas y/o en el complejo de Golgi. Consiste en la acetilación, ciclación y/o amidación de los neuropeptidos.

6. LOS NEUROPEPTIDOS SON LIBERADOS AL ESPACIO EXTRACELULAR MEDIANTE EXOCITOSIS

Las modificaciones químicas de los neuropeptidos sirven para potenciar/inhibir su actividad funcional y/o resistir más tiempo su degradación por las peptidasas (ver Coveñas et al., 2007a). Así:

1. La acción fisiológica de la alfa-MSH acetilada es mayor que cuando no está acetilada.
2. La acción fisiológica de la colecistoquinina sulfatada es más potente que la forma no sulfatada.
3. Cuando la beta-endorfina está acetilada, se inhibe su acción opiácea.
4. La amidación es necesaria, en muchos casos, para que el neuropeptido se active.
Si no ocurre, el neuropeptido no sería funcional (inactivo).
5. La amidación aumenta la afinidad de un neuropeptido por su receptor.
6. La sulfatación, amidación, acetilación, fosforilación y/o la glicosilación estabilizan a los neuropeptidos (encefalinas...) contra la degradación de las enzimas proteolíticas (peptidasas). Así, la vida media de los neuropeptidos es mayor, en comparación a cuando no sufren dichas modificaciones químicas, y por lo tanto su acción fisiológica es más duradera. Por ejemplo, la ACTH glicosilada tarda más en ser degradada que cuando no está glicosilada.

1.3.10 Mecanismos que regulan la síntesis de los neuropeptidos

La síntesis de los neuropéptidos puede estar regulada por numerosos factores. En este apartado sólo citaremos algunos de ellos (ver Coveñas et al., 2007a):

1. NEUROPEPTIDOS

Una vez que los neuropéptidos se unen a sus receptores correspondientes (localizados en la membrana plasmática) se desencadenan una serie de reacciones en el interior de la neurona (formación de AMPc.) que finalmente producen la activación de proteínas citoplasmáticas que controlan al ADN y por lo tanto regulan la síntesis de los neuropéptidos. En éste caso los neuropéptidos actúan como neuromoduladores. Así, por ejemplo, se ha demostrado que el neuropéptido Y controla (modula) la expresión del gen responsable de la formación del precursor pro-opio-melanocortina.

2. HORMONAS ESTEROIDEAS

Las hormonas esteroideas actúan también como moduladores. Tras unirse a sus receptores correspondientes (localizados en el citoplasma neuronal), el complejo formado por el receptor-hormona esteroidea regula la expresión del ADN, controlando por lo tanto la síntesis de neuropéptidos. Se ha demostrado, por ejemplo, que las hormonas esteroideas reducen la síntesis de sustancia P y de somatostatina en las neuronas sensoriales primarias (localizadas en los ganglios sensitivos), ya que tras realizar la adrenalectomía, aumentó el número de neuronas con sustancia P y con somatostatina.

3. LESIÓN

Tras realizar una axotomía se ha demostrado que se modifica la expresión de ciertos neuropéptidos. Así, en las neuronas simpáticas y en las neuronas sensitivas se observaron las siguientes modificaciones en las densidades de la inmunorreactividad

para varios neuropeptidos en condiciones normales (sin lesión) y tras realizar la axotomía:

Neuronas Simpáticas	<u>SIN LESIÓN</u>	<u>AXOTOMÍA</u>
Neuropeptido Y	+++	+
Sustancia P	+	+++
Polipéptido intestinal vasoactivo	+	+++
Galanina	+	+++

**Neuronas
Sensitivas**

Neuropeptido Y	+	+++
Sustancia P	+++	+

En condiciones normales (sin lesión), las neuronas de los ganglios simpáticos:

- a) Inervan una determinada zona en donde se sintetiza y se libera NGF (factor del crecimiento de los nervios). El NGF es captado por la célula nerviosa y transportado retrógradamente hacia el soma neuronal.
- b) Las neuronas sintetizan gran cantidad de neuropeptido Y y poca cantidad de sustancia P, polipéptido intestinal vasoactivo y galanina.

Sin embargo, cuando se realiza la axotomía ocurre:

- a) El axón no llega al sitio que inervaba y por lo tanto no capta NGF.
- b) La síntesis de neuropeptido Y disminuye y aumenta la síntesis de sustancia P, polipéptido intestinal vasoactivo y galanina. Se cree que tanto el polipéptido intestinal vasoactivo como la galanina son liberados al espacio extracelular y actúan como factores de crecimiento (neurotróficos), que junto con otros factores, ayudan a la regeneración del axón dañado, para que finalmente contacte con la zona que

inervaba antes de realizarse la axotomía. Una vez que se reestablece la conexión original, los niveles de los neuropéptidos mencionados vuelve a la normalidad (síntesis elevada de neuropéptido Y).

4. ACTIVINA A

Se ha demostrado que las células musculares lisas sintetizan y liberan activina A. En presencia de esta sustancia, neuronas que no sintetizan somatostatina en condiciones normales, inician la síntesis de dicho neuropéptido. Si las neuronas no están en contacto con la activina A, no expresan somatostatina.

5. COLCHICINA

La colchicina es una droga que se utiliza para poner de manifiesto, tras aplicar una técnica inmunocitoquímica, somas neuronales peptidérgicos. Ya que generalmente los neuropéptidos no se almacenan en los somas neuronales, sino que una vez que son sintetizados se transportan inmediatamente hacia las prolongaciones nerviosas. La colchicina inhibe dicho transporte, pero no la síntesis de los neuropéptidos (almacenados en las vesículas), por lo que se acumulan en el soma neuronal. Gracias a la acumulación de dichas vesículas se pueden observar somas peptidérgicos, tras aplicar una técnica inmunocitoquímica.

Sin embargo, se ha descrito que la colchicina puede, aunque es la excepción, en algunas zonas del sistema nervioso central afectar a la síntesis de determinados neuropéptidos. Así, por ejemplo, se ha demostrado que la colchicina aumenta la síntesis del ARNm de la galanina. Este descubrimiento indica que:

- a) Si bien la síntesis de determinados neuropéptidos se produce en condiciones normales, dicha síntesis puede aumentar cuando se administra colchicina.

- b) Determinados neuropeptidos que no se sintetizan en condiciones normales (sin colchicina), podrían sintetizarse cuando se administra colchicina.
- c) En aquellos trabajos de investigación en los que se utiliza la colchicina, para poner de manifiesto poblaciones neuronales peptidérgicas, deben de realizarse los controles y observaciones necesarias (animales de experimentación no tratados con la droga; confirmar la conservación de la morfología neuronal.) para descartar las posibles acciones, comentadas anteriormente, de la colchicina.

1.3.11 Liberación de los neuropeptidos

El potencial de acción es generado en el cono axónico y es propagado a lo largo del axón, hasta llegar a la terminación nerviosa, en donde se abren los canales de calcio en las zonas donde están las vesículas sinápticas, aumentándose la concentración del calcio intracelular. Estos mecanismos facilitan la unión de las membranas de las vesículas con neuropeptidos a la membrana presináptica. De esta forma, se liberan a partir de una vesícula, alrededor de unas 5.000 moléculas de neuropeptidos que actúan sobre el componente postsináptico una vez que se unen a sus receptores.

1.3.12 Receptores de neuropeptidos

Los receptores de neuropeptidos están principalmente acoplados a una proteína transmembrana denominada proteína G. La proteína G, a su vez, puede estar acoplada a (ver Coveñas et al., 2007a):

- a) **Adenilato-ciclasa.** La proteína G estimula a la enzima adenilato-ciclasa, la cual estimula la síntesis del segundo mensajero (AMPc). En éste caso la proteína G se denomina G_s.

b) Canal. La proteína G regula el flujo de iones a través del canal. Abre canales de potasio, cierra canales de calcio. Además, la proteína G inhibe a la adenilato-ciclasa.

En éste caso la proteína G se denomina $G_{i/o}$.

c) Fosfolipasa C. La proteína G activa a la fosfolipasa C que genera diacilglicerol e inositol trifosfato (IP_3). El IP_3 favorece la liberación del calcio (segundo mensajero), almacenado intracelularmente, y por lo tanto aumenta su concentración a nivel intracelular. En éste caso la proteína G se denomina $G_{q/11}$.

Se sabe que cuando la neurotensina se une a su receptor acoplado a una proteína G, se reduce la afinidad del receptor de la dopamina, que está situado próximo al receptor de la neurotensina, por la dopamina. Esto significa que:

1. La neurotensina controla la transmisión sináptica ejercida por la dopamina, mediante el mecanismo denominado interacción receptor-receptor (dopamina-neurotensina), ya que los receptores de la dopamina están semibloqueados.
2. Este mecanismo está muy extendido por el sistema nervioso. Así, se ha demostrado que la interacción receptor-receptor ocurre entre otros sistemas peptidérgicos y los neurotransmisores clásicos:
 - Colecistoquinina-8 regula a la dopamina
 - Neuropeptido Y regula a la adrenalina

1.3.13 Peptidasas

Una vez que los neuropéptidos se separan del receptor al que estaban unidos, son degradados mediante la acción de las peptidasas (ver Coveñas et al., 2007a). Las peptidasas se han localizado (su zona activa está orientadas hacia el espacio extracelular) en las membranas plasmáticas de las neuronas y de la neuroglía, así como en el plasma sanguíneo.

CLASIFICACIÓN DE LAS PEPTIDASAS

A) Endopeptidasas: rompen uniones de aminoácidos no terminales.

B) Exopeptidasas: rompen uniones de aminoácidos terminales.

ENDOPEPTIDASAS

1. Endopeptidasa 24.11 (EC 3.4.24.11; encefalinasa; endopeptidasa neutra)

Es una metalopeptidasa, que se ha localizado en el sistema nervioso central, en las membranas plasmáticas de las neuronas (a nivel de los terminales axónicos) y de los astrocitos, así como en el sistema nervioso periférico, en las membranas plasmáticas de las células de Schwann. Además, se ha descrito en el:

- Epitelio renal
- Nódulos linfáticos
- Células musculares del tracto gastrointestinal
- Glándulas salivares
- Glándulas adrenales
- Páncreas
- Pulmón

La misma endopeptidasa puede degradar a distintos neuropeptidos. Así, la endopeptidasa 24.11 es capaz de degradar, por ejemplo, a los siguientes neuropeptidos pertenecientes a diferentes familias peptidérgicas:

- Sustancia P
- Neuroquinina A y B
- Colecistoquinina-8
- Péptido Liberador de Gastrina
- Neurotensina
- Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante

- Leucina-encefalina
- Metionina-encefalina
- Alfa-neo-endorfina
- Beta-neo-endorfina
- Dinorfina (1-9)
- Dinorfina (1-13)
- Metionina-encefalina-Arg⁶-Phe⁷

2. Endopeptidasa 24.15

Es también una metalopeptidasa. Se ha localizado en el sistema nervioso central y en las fibras musculares localizadas en el tracto gastrointestinal. Concretamente se localiza en las membranas plasmáticas y en el citosol. Entre otros neuropéptidos, la endopeptidasa 24.15 degrada a la:

- Neurotensina
- Hormona liberadora de la hormona luteinizante
- Dinorfina
- Alfa-Neo-endorfina
- Metionina-encefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸

La degradación de la dinorfina y de la alfa-neo-endorfina por la endopeptidasa 24.15 origina, en ambos casos, leucina-encefalina, mientras que la degradación de la Met-encefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ origina metionina-encefalina.

3. Endopeptidasa 24.16

Ha sido localizada en las membranas plasmáticas a nivel del sistema nervioso central. Degrada a la neurotensina y a la neuromedina N.

EXOPEPTIDASAS

1. Peptidil dipeptidasa

Elimina dipéptidos " C " terminales. A este grupo de exopeptidasas pertenecen las enzimas EC 3.4.15.1 y la convertidora de angiotensina (ACE).

La ACE es una metalopeptidasa que se ha localizado en las membranas plasmáticas de las células epiteliales del pulmón y del riñón; en las membranas de las células de la hipófisis y en las membranas de las terminaciones nerviosas que inervan somas y dendritas. Además, se ha localizado en el plasma sanguíneo. No se ha encontrado ni en la glía ni en los somas neuronales.

La ACE degrada, por ejemplo, a los siguientes neuropeptidos:

- Beta-endorfina
- Dinorfina (1-6)
- Dinorfina (1-8)
- Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante
- Metionina-encefalina
- Metionina-encefalina-Arg⁶-Phe⁷
- Neurotensina
- Sustancia P

Además, la ACE degrada a la angiotensina I (inactiva) transformándola en angiotensina II (activa).

Finalmente, en varias enfermedades se han detectado cambios en los niveles de la ACE, en determinados núcleos del sistema nervioso central y/o en el líquido cefalorraquídeo:

- **Alzheimer:** aumento de los niveles de la ACE en el caudado, hipocampo y en la corteza frontal.
- **Huntington:** disminución de los niveles de la ACE en el caudado, putamen, globo pálido y en la sustancia negra.

- **Parkinson:** disminución de los niveles de la ACE en el líquido cefalorraquídeo.
- **Esquizofrenia:** disminución de los niveles de la ACE en la sustancia negra y en el líquido cefalorraquídeo.

2. Aminopeptidasas

Eliminan aminoácidos " N " terminales no amidados. Se han localizado en las membranas plasmáticas a nivel del sistema nervioso central y periférico, sí como en el plasma sanguíneo.

Se han descrito varias aminopeptidasas:

- **Aminopeptidasa N:** rompe aminoácidos " N " terminales ácidos.
- **Aminopeptidasa P:** rompe aminoácidos " N " terminales de péptidos con Prolina² (ej., sustancia P).
- **Aminopeptidasa B:** rompe residuos básicos del terminal " N ".
- **Dipeptidil Aminopeptidasa IV:** inactiva neurohormonas en el torrente circulatorio y rompe péptidos con Prolina² /Alanina² .

3. Carboxipeptidasas

Eliminan aminoácidos " C " terminales no amidados. En el caso de que los aminoácidos estuvieran amidados, no actúa. Pertenece a éste grupo la enzima carboxipeptidasa B exopeptidasa, que rompe residuos básicos localizados en el extremo " C "

1.4. ***PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA (CGRP)***

Forman parte de esta familia de péptidos, además del CGRP, la amilina y la calcitonina. El CGRP es un péptido que se genera a partir del gen de la calcitonina (hormona polipeptídica, producida en el tiroides, que reduce los niveles de calcio en la sangre). En mamíferos (rata, gato, mono, hombre), fibras y somas con CGRP están

ampliamente distribuidos tanto por el sistema nervioso central como por el periférico (Hawai et al., 1985; Hawai et al., 1985; Mulderry et al., 1985; Skofitsch y Jacobowitz, 1985ba, b, c; Kruger et al., 1988a, b; Palkovits, 1988; Batten et al., 1989; Conti y Sternini, 1989; McWilliam et al., 1989; Fabri y Conti, 1990; Tashiro et al., 1991; Unger et al., 1991; Quartu et al., 1992; ver Coveñas et al., 2007a; Marcos, 1999, 2007; Samsam et al., 1999, 2000, 2001; de Souza et al., 2007a, 2008). El CGRP interviene en (ver Coveñas et al., 2007a):

- A. Regular la diferenciación y la activación de la astrogliá
- B. Producir analgesia, anorexia, catalepsia e hipertermia
- C. Disminuir la actividad locomotora
- D. Regular el comportamiento social
- E. Regular (neuromodulador) la síntesis de neuropeptidos/neurotransmisores por las células nerviosas. Si durante el desarrollo ciertas neuronas no están en presencia de CGRP, éstas no expresan dopamina. El CGRP es responsable de que las neuronas produzcan dopamina
- F. Regular al sistema digestivo y excretor, ya que inhibe la movilidad (peristalsis) intestinal, la secreción enzimática de las células acinosas del páncreas exócrino y la secreción de insulina por las células beta del páncreas endocrino. Además, regula el transporte iónico intestinal, facilitando la excreción del ión cloro por las células epiteliales del colon y relaja la musculatura lisa produciendo vasodilatación en el tracto urinario. También, inhibe la secreción ácida (CIH) del estómago por las células parietales (oxínticas), inhibiendo la formación de úlceras en la mucosa duodenal o gástrica por la acción del jugo gástrico (CIH...)

- G. Producir la quimiotaxis de los linfocitos. Las fibras C (nociceptivas) liberan CGRP en la piel. Los linfocitos T emigran hacia la zona en donde se liberó CGRP. Además, se ha demostrado que el CGRP liberado es degradado por la endopeptidasa 24.11, originándose el fragmento val³²-gly-ser-glu³⁵. Este fragmento, originado a partir del CGRP, induce la emigración de los eosinófilos hacia el lugar en donde se encuentra.
- H. La vasodilatación. Las terminaciones nerviosas sensitivas (fibras C (nociceptivas)) liberan CGRP tras producirse un estímulo doloroso. Esta liberación favorece la vasodilatación. Este tipo de terminación nerviosa está presente en la pared de las arterias coronarias. Cuando se produce un estímulo nociceptivo, éste es transmitido al sistema nervioso central, pero además se produce la liberación de CGRP a partir de las terminaciones nerviosas que están en la arteria coronaria. El CGRP liberado produce la vasodilatación de la arteria, disminuyendo la presión arterial y aumentando el flujo sanguíneo. La vasodilatación se produce porque el CGRP se une a sus receptores localizados en las células endoteliales (revisten la luz de la arteria), desencadenándose en cadena una serie de reacciones intracelulares: hay estimulación de la adenilato-ciclasa, se aumentan los niveles de AMPc y se activa a la enzima NO sintetasa que forma óxido nítrico. Este llega a la fibra muscular lisa y favorece la síntesis de GMPc que produce la relajación muscular y por lo tanto la vasodilatación. También, el CGRP puede actuar directamente sobre la fibra muscular lisa facilitando la síntesis de AMPc y activando los canales de potasio (se produce una hiperpolarización de la fibra), de tal forma que estos procesos inducen la relajación muscular (vasodilatación). Así, la administración exógena de CGRP o de análogos produce efectos beneficiosos

en las funciones hemodinámicas de los enfermos con problemas cardiovasculares

- I. La regeneración de los nervios periféricos
- J. Induce apoptosis en los timocitos

1.5. LEUCINA-ENCEFALINA

El pentapéptido leucina-encefalina pertenece a la familia de péptidos opiáceos. Difiere en un aminoácido, si se compara con la secuencia de aminoácidos que presenta otro pentapéptido denominado metionina-encefalina. La leucina-encefalina presenta una amplia distribución por el sistema nervioso central de mamíferos (Kubek y Wilder, 1980; Di Figlia y Aronin, 1984; Yamano et al., 1985; Edwards et al., 1987; Palkovits, 1988; Cheng et al., 1996; ver Coveñas et al., 2007a; Marcos et al., 2007; Pego-Reigosa et al., 2007). Entre los péptidos opiáceos se encuentran la:

- Beta-Lipotropina
- Alfa-Endorfina
- Beta-Endorfina
- Gamma-Endorfina
- Metionina-Encefalina
- Metionina-encefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ (MERGL)
- Alfa-Neo-Endorfina
- Beta-Neo-Endorfina
- Dinorfina A
- Dinorfina B
- Nociceptina u orfanina FQ (se une al receptor huérfano ORL₁)

Se han descrito tres subfamilias de péptidos opiáceos según el precursor de dichos péptidos (Loh y Gainer, 1983; Khachaturian et al., 1984, 1985). A partir del precursor pro-opiomelanocortina se origina, por ejemplo, la α -endorfina, γ -endorfina, β -endorfina (1-31) y la β -endorfina (1-27); del precursor pro-enkefalina se originan la metionina-enkefalina, metionina-enkefalina-Arg⁶-Phe⁷, metionina-enkefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ y la leucina-enkefalina y del precursor pro-dinorfina se originan la dinorfina A (1-17), dinorfina A (1-18), dinorfina B (rimorfina), α -neo-endorfina y la β -neo-endorfina. También se sabe que el péptido no opiáceo, hormona adrenocorticotrópica, se origina a partir del precursor pro-opiomelanocortina y que la mencionada hormona y la beta-endorfina se originan exclusivamente del precursor pro-opiomelanocortina; la metionina-enkefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ deriva exclusivamente del precursor pro-enkefalina y la α -neo-endorfina se origina exclusivamente del precursor pro-dinorfina.

Las enkefalinas (metionina-enkefalina y leucina-enkefalina) han sido estudiadas en profundidad (distribución, funciones) en el sistema nervioso central de mamíferos (rata, gato, perro, mono, hombre) (Elde et al., 1976; Hökfelt et al., 1977; Watson et al., 1977; Sar et al., 1978; Finley et al., 1981; Cesselin et al., 1982; Haber y Elde, 1982a, b; Watson et al., 1982; Conrath-Verrier et al., 1983; Khachaturian et al., 1983; Bouras et al., 1984; Krukoff y Calaresu, 1984; Inagaki y Parent, 1985; Zamir et al., 1985; Maley et al., 1987; Palkovits, 1988; Ibuki et al., 1989; Marcos et al., 1998, 1999, 2007; Arvidsson et al., 1992; Pego-Reigosa et al., 2000, 2007; ver Coveñas et al., 2007a; de Souza et al., 2007a, b). Como hemos mencionado anteriormente, las enkefalinas presentan una amplia distribución en dicho sistema y han sido involucradas en la modulación de la transmisión nociceptiva (produciendo un efecto analgésico), en el aspecto afectivo de la sensación dolorosa, en la inhibición de la liberación de la

sustancia P, vasopresina, dopamina y acetilcolina, en la regulación de la hipófisis, en mecanismos visuales, respiratorios...

1.6 NEUROTENSINA

Hay numerosos estudios publicados sobre la distribución de la neurotensina en el sistema nervioso central de mamíferos y sobre las funciones en las que interviene (Kataoka et al., 1979; Uhl et al., 1979; Cooper et al., 1981; Jennes et al., 1982; Goedert y Mesón, 1983; Kalivas y Millar, 1984; Triepel et al., 1984; Moga y Gray, 1985; Mai et al., 1987; Seroogy et al., 1987; Palkovits, 1988; Studler et al., 1988; de León et al., 1991a, b; Marcos et al., 1996, 1997, 2007; ver Coveñas et al., 2007a). Algunas de ellas son las siguientes:

1. Hipotensión
2. Relajación muscular
3. Hipotermia
4. Reduce la actividad locomotora
5. Glucorregulación
6. Reduce la secreción por las células de la hipófisis de prolactina, hormona luteinizante y tirotrópina
7. Inhibe la secreción ácida gástrica
8. Estimula la secreción pancreática
9. Homeostasis
10. Reduce la ingesta de alimentos
11. Modula la liberación de dopamina

Además, se ha demostrado que tras administrar el neuropéptido neurotensina en la sustancia gris periacueductal se produce analgesia, la cual no es bloqueada por la naloxona. Hay datos que indican que en la sustancia gris periacueductal, la neurotensina excita a las neuronas que contienen aminoácidos excitadores (glutamato, aspártico) que proyectan al rafe magnus, en donde activan el sistema analgésico descendente. Sin embargo, si en la sustancia gris periacueductal se administran aminoácidos excitadores (glutamato/aspártico) o sustancias opiáceas endógenas o exógenas (morfina/enkefalinas) se produce analgesia, pero ésta es bloqueada por la naloxona (ver Mangas et al., 2007).

Se ha demostrado que la administración de haloperidol (neuroléptico antagonista de la dopamina) aumenta la expresión del ARNm de la neurotensina en el núcleo accumbens, no así en otros centros (hipotálamo). La unión del haloperidol a los receptores D₂ favorece la expresión de factores de transcripción (fos, jun), que tras unirse por ejemplo a la zona AP₁ del ADN, aumentan la expresión del ARNm de la neurotensina (ver Coveñas et al., 2007c). También, se ha descrito que en los esquizofrénicos hay una concentración baja de neurotensina en el líquido cefalorraquídeo. Al tratar con neurolépticos los valores normales de neurotensina se reestablecen. Esto indica que la neurotensina interviene en la patofisiología de la esquizofrenia (ver Coveñas et al., 2007c). Además, la administración de drogas (metanfetamina, cocaína, fenciclidina) que alteran la actividad dopaminérgica y producen síntomas esquizofrénicos:

- Reducen en el estriado la liberación de neurotensina
- Acumulan neurotensina en las terminaciones nerviosas
- Aumentan la concentración de neurotensina

Además, la administración de neurolépticos produce un aumento de la inmunorreactividad para la neurotensina en zonas ricas en dopamina (hay una

implicación anatómico-funcional entre la neurotensina y la dopamina). En conjunto, todos estos datos indican que la neurotensina ejerce una actividad antipsicótica y que la disminución de su liberación contribuiría al desarrollo de la esquizofrenia (ver Coveñas et al., 2007c).

Cuando se administró neurotensina, se produjeron efectos muy parecidos a cuando se administran drogas antipsicóticas o neurolépticos (ver Coveñas et al., 2007c). Esto quiere decir que la neurotensina:

- Es un neuropeptido endógeno antipsicótico. Sin embargo, hay inconvenientes para utilizar a la neurotensina como un antipsicótico, ya que tiene una vida media muy corta, atraviesa difícilmente la barrera hematoencefálica y porque debido a su amplia distribución en el sistema nervioso central actuaría ampliamente ejerciendo acciones no deseadas.
- Antagoniza la acción de la dopamina. Sin embargo, se sabe que la neurotensina no se une a los receptores dopaminérgicos, aunque la neurotensina es responsable de bloquear a los receptores de dopamina mediante la interacción receptor (neurotensina)-receptor (dopamina). Así, cuando se une la neurotensina a su receptor se produce:
 - a) una disminución muy significativa de la afinidad de los receptores de la dopamina por ésta
 - b) hay una disminución considerable de la dopamina que se une a los receptores dopaminérgicos D₂
 - c) los receptores dopaminérgicos D₂ están semibloqueados
 - d) se reducen las acciones ejercidas por la dopamina

1.7 SOMATOSTATINA

Se sabe que la somatostatina interviene en (ver Coveñas et al., 2007a):

1. La inhibición de la liberación de acetilcolina, noradrenalina, prolactina y de la hormona liberadora de tirotropina
2. Estimula la liberación de acetilcolina, noradrenalina, serotonina y dopamina
3. Disminuye las horas de sueño
4. Produce descoordinación motora
5. Produce analgesia
6. Aumenta la excitabilidad de la corteza cerebral
7. Interviene en mecanismos respiratorios
8. Produce hipersensibilidad a los estímulos táctiles
9. Inhibe la secreción de la hormona del crecimiento por las células de la hipófisis
10. Inhibe la secreción de insulina y de glucagón por las células del páncreas endocrino
11. Produce efectos neurotróficos
12. Suprime el crecimiento de ciertos tumores (neuroblastomas, meningiomas, gliomas)
13. Aumenta la duración de la fase REM del sueño
14. Modula la síntesis de citoquinas por los monocitos

La somatostatina, al igual que los anteriores neuropéptidos comentados muestra una amplia distribución por el sistema nervioso central de mamíferos (Hökfelt et al., 1984; Burnweit y Forssmann, 1979; Cooper et al., 1981; Finley et al., 1981; Takatsuki et al., 1981; Tramu et al., 1981; Benoit et al., 1982; Cesselin et al., 1982; Sorensen, 1982; Graybiel y Elde, 1983; Morrison et al., 1983; Oertel et al., 1983; Reichlin, 1983; Johansson et al., 1984; Guy et al., 1985; Moga y Gray, 1985; Vincent et al., 1985; Bennet-Clarke, 1986; Lewis et al., 1986; Bouras et al., 1987; Campbell et al., 1987; Palkovits, 1988; Amaral et al., 1989; Chigr et al., 1989; de León et al., 1991c, 1992a;

Irritan y Satoh, 1991; ver Coveñas et al., 1994, 2007a; Pego-Reigosa et al., 2001, 2007; Martín et al., 2003; Marcos, 2007). En general, la somatostatina, sus fragmentos y sus análogos aumentan la temperatura corporal. En ratones obesos, se ha observado que presentan una baja concentración de somatostatina, así como una distribución de este neuropeptido es más reducida en el sistema nervioso central en comparación a la que presenta los animales normales (no obesos). Cuando los ratones obesos se exponen al frío (4° C), sufren una hipotermia y mueren. Sin embargo, si son tratados con análogos de somatostatina, no se produce hipotermia. Todo lo contrario, hay hipertermia. Estos datos indican: que en los ratones obesos, al poseer una baja concentración de somatostatina en el sistema nervioso central, se produce un fallo en la termorregulación (hipotermia), ya que las vías peptidérgicas con somatostatina están alteradas y que la somatostatina, en los animales controles expuestos al frío y en los animales obesos que la recibieron, está implicada en los mecanismos de termorregulación, pues produce un efecto hipertérmico (ver Mangas et al., 2007).

Finalmente, en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes depresivos se ha observado una disminución de la concentración de somatostatina (ver Mangas et al., 2007).

1.8. HORMONA ADRENOCORTICOTRÓPICA (ACTH)

Se ha demostrado que la ACTH interviene en (ver Coveñas et al., 2007a):

1. Facilitar los mecanismos de aprendizaje y de memoria
2. Producir hiperalgesia
3. Favorecer la liberación de acetilcolina
4. La agresividad

5. La termorregulación
6. El estrés
7. El comportamiento sexual
8. Mecanismos motores
9. Regular la postura
10. Ejerce efectos neurotróficos
11. Mecanismos cardiovasculares: taquicardia y efectos presores
12. Ejerce una acción anticonvulsiva

Además, se sabe que la ACTH suprime la producción de anticuerpos y la producción de linfoquinas; así como bloquea los efectos favorables sobre la memoria que ejercen la adrenalina y las anfetaminas (ver Coveñas et al., 2007c). En los suicidas se han observado niveles altos de ACTH, ya que el eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal está alterado. Además, se ha descrito que la administración de ACTH a ratas recién nacidas produjo: disminución del peso corporal; disminución de los niveles de ACTH y de corticosterona en el plasma; una mayor respuesta al estrés (los animales son más propensos al estrés); y aumento de los niveles de monoaminas en el cerebro anterior. Esta modificación se mantiene hasta un año después de la administración de ACTH. Estas observaciones indican que la ACTH administrada en fases tempranas de la vida produce efectos secundarios, repercutiendo en el peso, los niveles de neuropéptidos y de monoaminas y en la respuesta al estrés (ver Coveñas et al., 2007c). Numerosos estudios han demostrado la distribución de la ACTH en el sistema nervioso central de mamíferos (Pelletier y Leclerc, 1979; Abrams et al., 1980; Joseph, 1980; Joseph et al., 1983, 1988; Romagnano y Joseph, 1983; Kitahama et al., 1984, 1986; Khachaturian et al., 1985a; Rao et al., 1986; Palkovits y Eskay, 1987; Palkovits, 1988;

Léger et al., 1990, 1994; Zaphiropoulos et al., 1991; Austin et al., 1995; ver Coveñas et al., 1996c, 1997, 2007a; Pego-Reigosa et al., 2004, 2007; Marcos et al., 2007).

II. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y APLICACIONES FUTURAS

2.1. JUSTIFICACIÓN

La distribución de neuropeptidos en el sistema nervioso central de mamíferos, mediante la aplicación de técnicas inmunocitoquímicas, viene realizándola nuestro grupo de investigación desde el año 1983. Hasta hoy hemos descrito en el sistema nervioso central de mamíferos la distribución de fibras y somas que contienen neuropeptidos pertenecientes a numerosas familias de neuropeptidos (péptido liberador de gastrina, colecistoquinina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, neuropeptido Y, neurotensina, oxitocina, somatostatina, taquiquinas (neuroquinina A, sustancia P), opiáceos (metionina-enkefalina, metionina-enkefalina-8, alfa-neo-endorfina, beta-endorfina, dinorfina A), hormona adrenocorticotrópica, hormona estimulante de los melanocitos, galanina, hormona liberadora de la hormona luteinizante, angiotensina II y factor liberador de corticotropina. Estos estudios fueron realizados en rata, cobaya, gato, perro, mono y hombre. Estos trabajos han aportado, principalmente, datos pioneros sobre la presencia de fibras y somas con neuropeptidos en el sistema nervioso central de mamíferos en general y/o en una determinada especie en particular (Conrath et al., 1986; Coveñas et al., 1986, 1988, 1989a,b, 1990a, b, c, 1993, 1994, 1996a, b, c, 1997, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003a, b, 2004, 2008; Burgos et al., 1988; Aguirre et al., 1989a, b; Fuxe et al., 1990; de León et al., 1991a, b, c; 1992a, b; 1992a, b, 1994; Marcos et al., 1993a, b, 1994a, b, c; 1996, 1997, 1998; Velasco et al., 1993; Vázquez et al., 1998; Samsam et al., 1999, 2000, 2001; Belda et al., 2000, 2003; Pego-Reigosa et al., 2000, 2001; Pesini et al., 2001, 2004; Martín et al., 2003; Aguilar et al., 2004; Cuadrado et al., 2005; Sánchez et al., 2005, 2007; Díaz-Cabiale et al., 2008). Entre otras aplicaciones, estos trabajos abren la puerta a los fisiólogos, para que estudien

en determinadas zonas del sistema nervioso central las acciones que puedan ejercer los neuropéptidos.

En la alpaca, nuestro grupo de investigación ha estudiado recientemente la distribución de las fibras y somas neuronales con CGRP o con leucina-encefalina en el tronco del encéfalo (de Souza et al., 2007a, b, 2008). Si bien hay numerosos estudios sobre la función reproductiva de los camélidos sudamericanos (Bravo et al., 1996; Correa et al., 1997; Ratto et al., 1997, 2005, 2006) hasta la publicación de los dos mencionados trabajos, no existían datos sobre la presencia de fibras y somas peptidérgicos en el sistema nervioso de la alpaca, tras aplicar una técnica inmunocitoquímica.

2.2. OBJETIVOS

Según lo indicado en el último párrafo, los objetivos planteados en la tesis doctoral son los siguientes:

1. Estudiar en el diencefalo de la alpaca la distribución del CGRP y de la leucina-encefalina, tras aplicar una técnica inmunocitoquímica. Para complementar los resultados obtenidos previamente en el tronco del encéfalo de la alpaca con ambos neuropéptidos
2. Estudiar en el diencefalo de la alpaca la distribución de neurotensina, somatostatina y ACTH, tras aplicar una técnica inmunocitoquímica.

Con este trabajo, ponemos las “primeras piedras” para conocer la distribución de los neuropéptidos en el diencefalo de la alpaca, ya que es la primera vez que se estudian los cinco neuropéptidos mencionados en el diencefalo de la alpaca. La obtención de los encéfalos de dichos animales ha sido posible gracias a la colaboración científica

existente entre el Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL, Salamanca) y la Universidad Peruana “Cayetano Heredia” (Lima, Perú).

2.3. APLICACIONES FUTURAS

Queremos reseñar que el conocimiento de la distribución de los somas y de las fibras peptidérgicas en el sistema nervioso central de mamíferos en general y de la alpaca en particular permitirá:

1. Comparar la distribución del mismo neuropeptido en el sistema nervioso central de varias especies (rata, gato, perro, mono, hombre). Este estudio comparativo nos permite conocer, en las distintas especies estudiadas, si la distribución de un neuropeptido es parecida o no. También, nos permite afirmar, en el caso que la distribución sea diferente, si es debida a que:

- Hay diferencias entre las especies estudiadas (es decir que en una especie la distribución de un neuropeptido es más amplia que en la otra especie) o
- Las diferencias podrían ser debidas a que la metodología que se ha empleado en ambas especies no ha sido la misma (ej. en una especie se administra colchicina, en la otra no).

2. Permite conocer si hay una relación anatómica entre dos o más neuropeptidos. Es decir, conocer si en la mayoría de los núcleos del sistema nervioso central en donde encontramos, por ejemplo neurotensina, encontramos también somatostatina. Si existiera esta relación anatómica, se podría plantear la hipótesis de una relación funcional entre ambos neuropeptidos (ej. que la neurotensina controlase la liberación de la somatostatina o viceversa).

3. Las técnicas inmunocitoquímicas permiten también proponer la coexistencia de neuropéptidos. Ya que si las características morfológicas (tamaño, forma), así como la distribución dentro del núcleo de las neuronas peptidérgicas con metionina-encefalina coinciden plenamente con las que contienen otro neuropéptido, se puede afirmar que ambos neuropéptidos podrían coexistir en la misma neurona.
4. También, permiten proponer vías peptidérgicas. Así, si en un núcleo encontramos que hay numerosos somas inmunorreactivos y ninguna fibra (axón) inmunorreactiva, indica que las neuronas peptidérgicas observadas son neuronas de proyección (eferentes: envían sus axones fuera del núcleo). Mientras, que si encontramos en un núcleo muchas fibras inmunorreactivas y ningún soma, indicaría que dicho núcleo recibe aferencias peptidérgicas.
5. Por último, dependiendo en dónde se localiza el neuropéptido estudiado, se pueden proponer las posibles acciones fisiológicas que podría realizar dicho neuropéptido. Así, si demostramos tras aplicar una técnica inmunocitoquímica, la presencia de fibras inmunorreactivas conteniendo un determinado neuropéptido en un núcleo que se sabe previamente que interviene en la transmisión del dolor, la presencia de dicho neuropéptido indica que podría intervenir en transmitir y/o modular la información nociceptiva.
6. En el caso de la alpaca, hemos de indicar que los resultados obtenidos en la tesis doctoral han sido a partir de animales que vivieron siempre a nivel del mar. En un futuro, compararemos los resultados obtenidos en la tesis doctoral con aquellos que se obtengan a partir de animales que vivieron siempre a más de 3.500 m de altitud, ya que en estos últimos tenemos pensado estudiar la distribución (fibras y somas) de los neuropéptidos CGRP, ACTH, leucina-encefalina, neurotensina y somatostatina en el diencéfalo de la alpaca.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales y perfusión

Hemos utilizado cuatro alpacas (raza huacaya) machos adultos (*Lama pacos*) (70-80 kg) suministrados por la Facultad de Veterinaria de la Universidad Cayetano Heredia (Lima, Perú). Los animales fueron mantenidos (altitud: 0 m sobre el nivel del mar) en condiciones estándar de luz, temperatura y alimentación (acceso libre al alimento y agua) (ver de Souza et al., 2007b, 2008). Los animales, una vez anestesiados profundamente con ketamina (10 mg/kg) y xilacina (4 mg/kg) (ambos suministrados vía intravenosa), fueron perfundidos a través de la carótida con 3 l de solución salina (0,9%) seguido de 5 l de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS) (pH 7,2) (ver de Souza et al., 2007b, 2008). A continuación, los diencéfalos fueron diseccionados y postfijados durante 12 h en el mismo fijador. Posteriormente, los diencéfalos se colocaron en soluciones crecientes de sacarosa (10% al 30%) con la finalidad de crioprotegerlos. Más tarde, secciones transversales seriadas de 50 µm de grosor del diencéfalo fueron obtenidas en un criostato y almacenadas a 4° C en PBS. Finalmente, a las secciones se les aplicó una técnica inmunocitoquímica o la técnica del violeta de cresilo (de Souza et al., 2007b, 2008; Mangas et al., 2007).

3.2. Inmunocitoquímica

A las secciones obtenidas le aplicamos la técnica inmunocitoquímica del ABC. Se realizaron los siguientes pasos (ver de Souza et al., 2007b, 2008):

1. Las secciones fueron introducidas en una solución de agua oxigenada y metanol, durante 20 min (reposo y oscuridad)
2. Las secciones fueron lavadas durante 20 min en PBS (agitación)
3. Preincubación de las secciones en PBS que contiene 1% de suero normal de caballo y

- 0,3% de Triton X-100 (mezcla) durante 30 min (agitación)
4. Incubación en el primer anticuerpo. A continuación, las secciones se incubaron en el primer anticuerpo (anti-CGRP: dilución: 1/3.000; anti-leu-encefalina: 1/3.000; anti-hormona adrenocorticotrópica (18-39): 1/1.000; anti-somatostatina-28 (1-12): 1/5.000, anti-neurotensina: 1/1.000), diluidos en la mezcla del paso tres durante 16 h a 4° C (reposo) (ver Coveñas et al., 2000; de Souza et al., 2007b, 2008).
 5. Lavado de las secciones en la mezcla durante 30 min (agitación).
 6. Incubación durante 60 min en un anticuerpo biotinilado anti-conejo diluido 1/200 en la mezcla (agitación)
 7. Lavado de 30 min en la mezcla (agitación)
 8. Las secciones se incubaron durante 60 min (agitación) en la mezcla que contiene el complejo avidina-biotina, unido a peroxidasa (ABC) diluido 1/100
 9. Las secciones fueron lavadas en la mezcla, durante 30 min (agitación)
 10. Las secciones fueron lavadas en Tris-ClH (pH 7,6), durante 10 min (reposo)
 11. Se realizó el revelado de la peroxidasa con agua oxigenada y con el cromógeno 3, 3'-diaminobenzidina (disuelto en Tris-ClH), durante 5-10 min en reposo y en oscuridad
 12. Finalmente, las secciones fueron montadas en portas y cubiertas con una solución de montaje (glicerol: PBS, 1/1), tras lo cual se colocó el cubre

3.3. Obtención y especificidad de los anticuerpos

Los anticuerpos primarios policlonales utilizados en este estudio se obtuvieron en conejo. Dichos anticuerpos se dirigen contra sus inmunógenos respectivos, que se prepararon acoplado la molécula peptídica sintética completa a una proteína transportadora (seroalbúmina humana) con glutaraldehído: a un péptido completo, en el

caso de la leucina-encefalina, neurotensina y péptido relacionado con el gen de la calcitonina; a fragmentos peptídicos, como la porción 1-12 de la somatostatina 28 y el fragmento 18-39 de la hormona adrenocorticotrópica. Los conejos se inmunizaron inicialmente con estos inmunógenos emulsionados con adyuvante de Freund completo. Se administraron dosis de recuerdo con adyuvante de Freund incompleto a intervalos de dos semanas. El plasma se extrajo de los conejos 10 días después de tres dosis de recuerdo y, luego, periódicamente (ver Marcos et al., 1999).

La especificidad de los anticuerpos primarios, utilizados en este estudio, ha sido demostrada previamente (de León et al., 1991a, b, c, 1992a; Coveñas et al., 1996c, 1997; Marcos et al., 1999; Samsam et al., 1999, 2000, 2001; Pego-Reigosa et al., 2001; Martín et al., 2003; Pesini et al., 2004; de Souza et al., 2007b, 2008). Además, indicamos a continuación los controles realizados para confirmar la especificidad de la inmunorreactividad observada:

1. Sustitución del primer anticuerpo por mezcla
2. Preabsorción del primer anticuerpo con el péptido sintético correspondiente (100 µg/ml de anticuerpo diluido) (ej., anti-CGRP con CGRP, anti-leu-encefalina con leucina-encefalina)
3. Preabsorción del primer anticuerpo con otros péptidos (10^{-7} M) (ej., anti-leucina-encefalina con metionina-encefalina, anti-CGRP con hormona adrenocorticotrópica (18-39)).

En todos los casos, los controles realizados confirmaron la especificidad de los anticuerpos utilizados en este estudio tal y como ha sido demostrado previamente (de León et al., 1991a, b, c, 1992a; Coveñas et al., 1996c, 1997; Marcos et al., 1999; Samsam et al., 1999, 2000, 2001; Pego-Reigosa et al., 2001; Martín et al., 2003; Pesini et al., 2004; de Souza et al., 2007b, 2008).

3.4. Cartografía

La cartografía ha sido realizada según las secciones del diencefalo de la alpaca teñidas con violeta de cresilo: secciones consecutivas a aquellas a las que le aplicamos la técnica inmunocitoquímica fueron teñidas con el mencionado colorante. Además, los distintos centros del diencefalo de la alpaca fueron localizados principalmente con la ayuda del atlas del sistema nervioso central de *Lama glama* (Llama) (obtenido a partir de la colección de cerebros de mamíferos de la Universidad de Wisconsin, Madison, USA), aunque también utilizamos otros atlas de mamíferos no-camélidos (rata, gato) (Berman, 1968; Paxinos y Watson, 1998). Para la nomenclatura de los núcleos del diencefalo de la alpaca, seguimos la utilizada en los tres atlas mencionados anteriormente.

3.5. Densidades de las fibras y de los somas inmunorreactivos

La densidad de las fibras inmunorreactivas observadas se ha clasificado en cuatro categorías: alta, moderada, baja y escasas (unas pocas fibras por sección). Para determinar la densidad de dichas fibras, hemos comparado los resultados obtenidos en la alpaca con las densidades que aparecen en cuatro fotografías realizadas al mismo aumento con que observamos los preparados de la alpaca, en las que se han establecido previamente los cuatro grados de densidad (Coveñas et al., 1999).

Respecto a la densidad de los somas inmunorreactivos, consideramos una densidad alta cuando observamos más de 20 somas por sección; una densidad moderada, entre 10-20 somas por sección y una densidad baja cuando observamos menos de 10 somas por sección (Coveñas et al., 1999).

Las fotografías se realizaron con una cámara digital Olympus DP-50 acoplada a un microscopio Kyowa Unilux-12. Para mejorar la calidad de las imágenes, sólo se ajustaron el brillo y el contraste de estas.

IV. RESULTADOS

ABREVIATURAS

“A”

- **AD** : Núcleo anterior dorsal
- **AHy**: Área hipotalámica anterior
- **AM**: Núcleo anterior medial
- **Arc**: Núcleo arcuatus
- **AV** : Núcleo anterior ventral

“C”

- **CL** : Núcleo central lateral
- **CM**: Núcleo central medial

“D”

- **DA** : Área hipotalámica dorsal

“F”

- f**: Fornix

“L”

- **LD** : Núcleo lateral dorsal
- **LH** : Área hipotalámica lateral
- **LHb**: Núcleo habenular lateral
- **LM**: Núcleo mamilar lateral
- **LP** : Núcleo lateral posterior

“M”

- **MD:** Núcleo medial dorsal
- **ME:** Eminencia media
- **MHb:** Núcleo habenular medial
- **MM:** Núcleo mamilar medial

“P”

- **PC :** Núcleo paracentral
- **PH :** Área hipotalámica posterior
- **PVA:** Núcleo paraventricular anterior talámico
- **PVH:** Núcleo paraventricular hipotalámico

“R”

- **Re :** Núcleo reuniens
- **Rh :** Núcleo rhomboidens
- **Rt :** Núcleo reticular talámico

“S”

- **SCh:** Núcleo supraquiasmático
- **SO :** Núcleo supraóptico
- **SPF:** Núcleo subparafascicular
- **STh:** Subtálamo

“V”

- **VA :** Núcleo ventral anterior

- **VL** : Núcleo ventral lateral
- **VM** : Núcleo ventral medial
- **VMH**: Núcleo ventromedial hipotalámico
- **VPL**: Núcleo ventral posterior lateral
- **VPM**: Núcleo ventral posterior medial

“Z”

- **ZI**: Zona incerta

TABLA I. Distribución de neuropeptidos en el diencefalo de la alpaca

NÚCLEOS	CGRP		LEU		SOM		NT		ACTH	
	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F
AD	-	-	-	-	-	+	-	++	-	-
AHy	+	++	-	+++	-	+++	+	+++	-	+++
AM	-	+	-	-	-	++	-	+	-	-
Arc	-	+	-	++/+++	+	+++	-	++	-	+++
AV	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
CL	-	+	-	-	-	++	-	+	-	-
CM	-	++	-	+/>+++	-	+++	-	+++	-	+
DA	+	++	-	+++	-	+++	+	+++	-	++
Alrededor f	+	++	-	+++	-	+++	+/+++	+++	-	++/+++
LD	-	+	-	-	-	+/+++	-	+	-	-
LH	+	++	+/-	++	+++	+++	+	+++	-	++
LHb	-	+	-	++/+++	-	+++	-	+	-	S
LM	-	++	-	+	-	+++	-	+++	-	S
LP	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
MD	-	+	-	+	-	+++	-	+	-	S
ME	-	-	-	+++	-	-	-	+/+++	-	S
MHb	-	S	-	-	-	+	-	S	-	-
MM	-	+	-	+	-	+	-	S	-	S
PC	-	+	-	-	-	++	-	+/>S	-	-
PH	+	++	-	++	-	+++	-	+++	-	+++
PVA	-	+	-	++	-	+++	-	++	-	++
PVH	+++	++	+++	+++	-	+++	-	+++	-	+++
Re	-	++	-	+	-	+++	-	++/+++	-	+/+++
Rh	-	++	-	+	-	+++	-	+++	-	+
Rt	-	-	-	-	-	++	-	+/+++	-	-
SCh	-	+	-	+++	-	+++	+	+++	-	+++
SO	+++	+	-	+++	-	+++	-	S	-	++
SPF	-	++	-	++	-	+++	-	+++	-	++
STh	-	+/+++	-	S	-	++	-	S	-	S
VA	-	+	-	-	-	++	-	+	-	-
VL	-	+	-	-	-	++	-	+	-	-
VM	-	+	-	-	-	++	-	+	-	-
VMH	+	++	-	+++	+/>-	+++	+	+++	-	+++
VPL	-	+	-	-	-	++	-	S	-	-
VPM	-	+	-	-	-	++	-	S	-	-
ZI	-	++	-	++	-	++	+	+++	-	+

F: fibras (+++: alta densidad; ++: densidad moderada; +: baja densidad; S: escasas fibras). **S:** somas (+++: alta densidad; ++: densidad moderada; +: baja densidad).

ACTH: hormona adrenocorticotrópica; **CGRP:** péptido relacionado con el gen de la calcitonina; **LEU:** leucina-encefalina; **NT:** neurotensina; **SOM:** somatostatina. Ver la lista de abreviaturas para la nomenclatura de los núcleos diencefálicos

4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Hemos estudiado en el diencefalo de la alpaca cinco neuropeptidos (CGRP, leucina-encefalina, somatostatina, neurotensina y ACTH). Hemos observado la presencia de estructuras inmunorreactivas en un total de 36 núcleos/regiones diencefálicas (Tablas I-VI y Figuras 1-5).

Somas

No hemos observados somas con CGRP en el diencefalo de la alpaca, sin embargo sí hemos encontrado somas peptidérgicos con CGRP, leucina-encefalina, somatostatina o neurotensina. En todos los casos, los somas peptidérgicos fueron localizados en el hipotálamo de la alpaca; no hemos observados somas peptidérgicos en el tálamo de *Lama pacos*. Somas con CGRP fueron observados en 8 núcleos/regiones de los 36 estudiados (es decir en el 22,22% de los núcleos), somas con neurotensina en 7 núcleos/regiones (19,44%), somas con somatostatina en 3 núcleos/regiones (8,33%) y somas con leucina-encefalina en 2 núcleos (5,56%) (Tablas I-III y Figuras 1, 2, 4).

Somas con los cuatro neuropeptidos (CGRP, leucina-encefalina, somatostatina, neurotensina) se han observado solamente en el área hipotalámica lateral. En el núcleo ventromedial hipotalámico hemos encontrado somas con CGRP, somatostatina o con neurotensina. En el núcleo paraventricular hipotalámico hemos observado una densidad alta de somas peptidérgicos conteniendo CGRP o leucina-encefalina. Somas con CGRP o con neurotensina han sido observados en el área hipotalámica anterior, alrededor del fornix, área hipotalámica lateral y en el área hipotalámica dorsal (Tabla I).

Fibras

Hemos observado fibras peptidérgicas conteniendo los 5 neuropeptidos estudiados en el diencefalo de la alpaca. En el caso de la neurotensina hemos encontrado fibras inmunorreactivas en 36 de los 36 núcleos/regiones diencefálicas (100%), fibras con

somatostatina en 35 de los 36 núcleos/regiones (97,22%), fibras con CGRP en 32 núcleos/regiones (88,89%) y fibras con leucina-encefalina o con ACTH en 22 núcleos/regiones (61,11 %) (Tablas I-III, V y Figuras 1-4). En un total de 19 núcleos/regiones se ha observado una densidad alta de fibras inmunorreactivas con somatostatina, mientras que en 16 núcleos/regiones encontramos una alta densidad de fibras con neurotensina, 10 núcleos/regiones para la leucina-encefalina (densidad alta), 7 núcleos/regiones para la ACTH (densidad alta) y 0 núcleos/regiones para el CGRP (densidad alta). Estos datos indican que la somatostatina es el neuropéptido más abundante en el diencefalo de la alpaca.

En los siguientes núcleos/regiones hemos observado fibras peptidérgicas con los 5 neuropéptidos estudiados: área hipotalámica anterior, núcleo arcuatus, núcleo central medial, área hipotalámica dorsal, alrededor del fornix, área hipotalámica lateral, núcleo habenular lateral, núcleo mamilar lateral, núcleo medial dorsal, núcleo mamilar medial, área hipotalámica posterior, núcleo paraventricular anterior talámico, núcleo paraventricular hipotalámico, núcleo reuniens, núcleo rhomboidens, núcleo supraquiasmático, núcleo supraóptico, núcleo subparafascicular, subtálamo, núcleo ventromedial hipotalámico y zona incerta (Tablas I, IV). Estos datos indican que existe una estrecha relación anatómica en el diencefalo de la alpaca entre los 5 neuropéptidos estudiados y probablemente dicha relación anatómica sea también funcional.

TABLA II. Número de núcleos con inmunorreactividad en el diencefalo de la alpaca

Neuropeptidos	SOMAS	FIBRAS
CGRP	8	32
LEU	2	22
SOM	3	35
NT	7	36
ACTH	0	22

Se indica el número de núcleos que presentan somas o fibras peptidérgicas en el diencefalo de la alpaca. El número total de núcleos diencefálicos es de 36.

FIGURA 1. Número de núcleos diencefálicos con inmunorreactividad en la alpaca

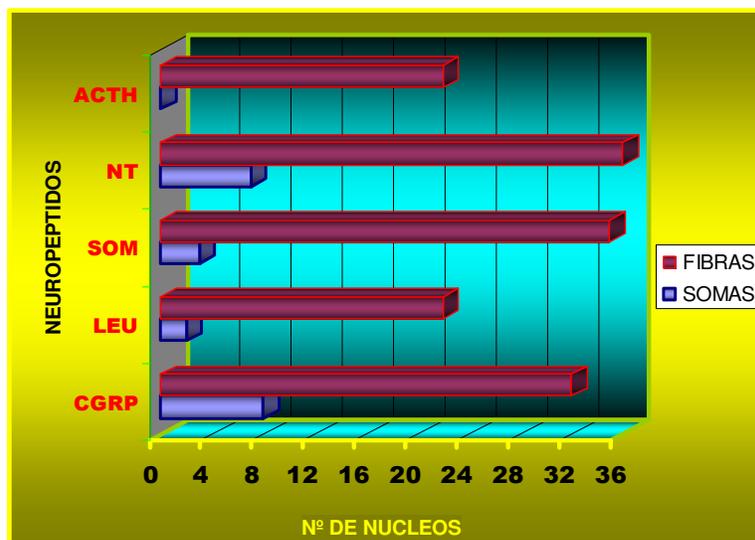


TABLA III. Porcentaje de los núcleos diencefálicos de la alpaca que presentan inmunorreactividad. El número total de núcleos es de 36.

Neuropéptidos	SOMAS	FIBRAS
CGRP	22,22	88,89
LEU	5,56	61,11
SOM	8,33	97,22
NT	19,44	100
ACTH	0	61,11

FIGURA 2. Porcentaje de los núcleos diencefálicos de la alpaca que presentan inmunorreactividad. Número total de núcleos: 36

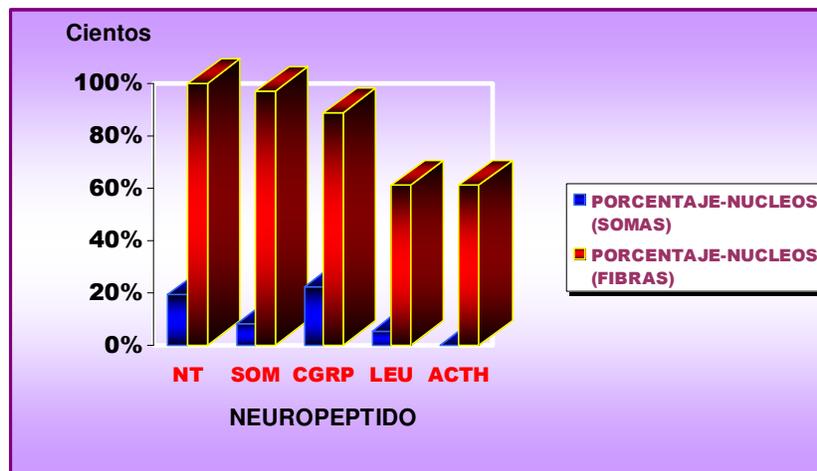


TABLA IV. Indica el número de neuropeptidos (ratio) y el porcentaje observado por núcleo (de un total de 5 neuropeptidos)

NUCLEOS	RATIO	PORCENTAJE	NUCLEOS	RATIO	PORCENTAJE
AHy	5/5	100%	AM	3/5	60%
Arc	5/5	100%	CL	3/5	60%
CM	5/5	100%	LD	3/5	60%
DA	5/5	100%	LP	3/5	60%
Alrededor f	5/5	100%	ME	3/5	60%
LH	5/5	100%	MHb	3/5	60%
LHb	5/5	100%	PC	3/5	60%
LM	5/5	100%	VA	3/5	60%
MD	5/5	100%	VL	3/5	60%
MM	5/5	100%	VM	3/5	60%
PH	5/5	100%	VPL	3/5	60%
PVA	5/5	100%	VPM	3/5	60%
PVH	5/5	100%	AD	2/5	40%
Re	5/5	100%	AV	2/5	40%
Rh	5/5	100%	Rt	2/5	40%
SCh	5/5	100%			
SO	5/5	100%			
SPF	5/5	100%			
STh	5/5	100%			
VMH	5/5	100%			

TABLA V. Indica el número de núcleos en donde se encuentran dos neuropéptidos. El porcentaje indica, por ejemplo, que en el 97,22% de los núcleos en donde hay neurotensina (NT), también hay somatostatina (SOM). Número total de núcleos: 36

RELACION	RATIO	PORCENTAJE
NT/SOM	36/35	97,22
NT/CGRP	36/32	88,89
NT/LEU	36/22	61,11
NT/ACTH	36/22	61,11

FIGURA 3. Representación gráfica de los datos indicados en la Tabla V

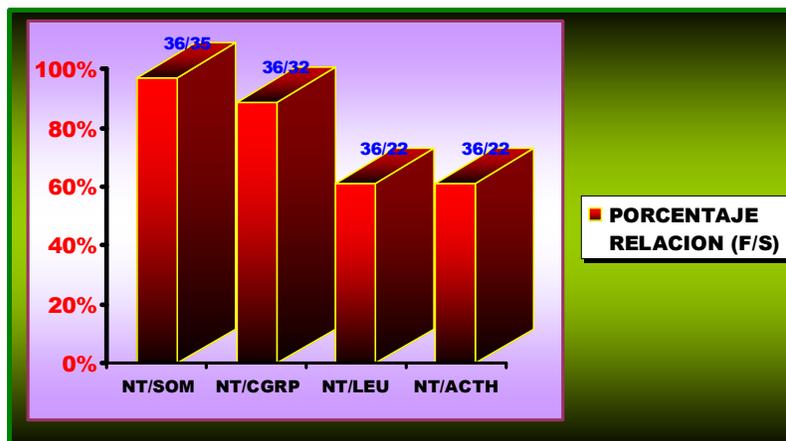


FIGURA 4. Indica el número de núcleos del diencefalo de la alpaca que contienen fibras o somas peptidérgicos. Número total de núcleos: 36

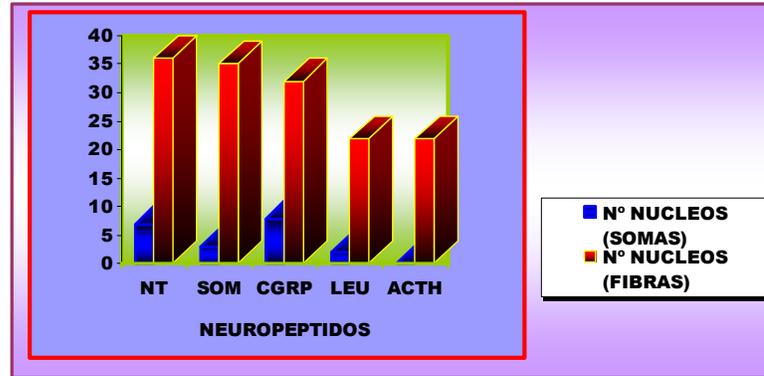
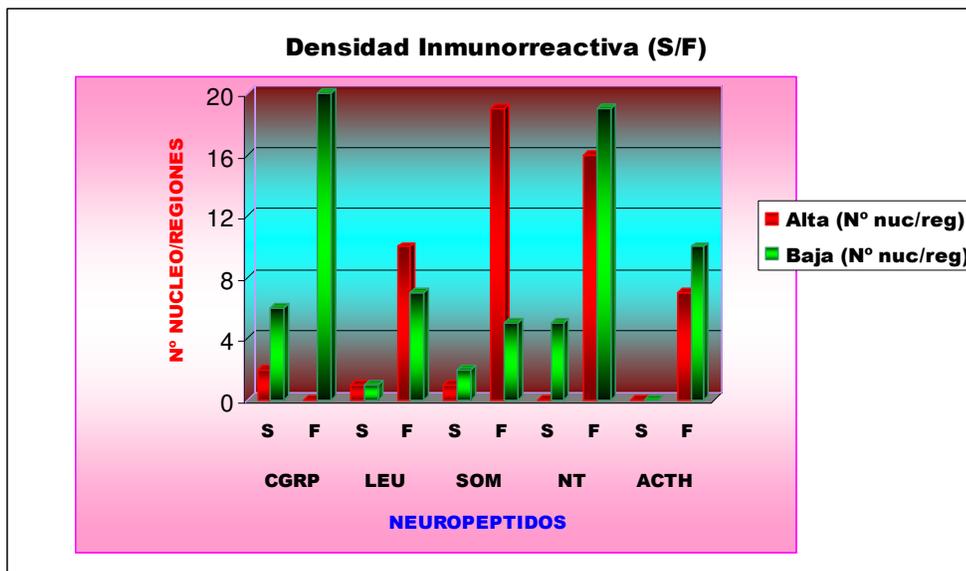


TABLA VI. Indica el número de núcleos del diencefalo de la alpaca en donde hemos observado una alta o baja densidad de somas (S) y fibras (F) inmunorreactivas

Densidad	CGRP		LEU		SOM		NT		ACTH	
	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F
Alta	2	0	1	10	1	19	0	16	0	7
Baja	6	20	1	7	2	5	5	19	0	10

FIGURA 5. Representación gráfica de los datos indicados en a Tabla VI



4.2. DISTRIBUCIÓN DE CGRP EN EL DIENCÉFALO DE LA ALPACA

A. SOMAS

Hemos observado una alta densidad de somas inmunorreactivos en el núcleo paraventricular hipotalámico (Figs. 7E, F; 8A), en el núcleo supraóptico (Fig. 7B-D) y en la zona situada ventralmente al fornix (Figs. 8E, F; 9A). Encontramos una baja densidad de somas inmunorreactivos con CGRP en el área hipotalámica anterior (Fig. 8D), área hipotalámica dorsal, alrededor del fornix (Fig. 9C), área hipotalámica lateral (Fig. 9D), área hipotalámica posterior, núcleo ventromedial hipotalámico (Fig. 9B), debajo del núcleo ventral posterior medial (Fig. 10A-D, F) y sobre la sustancia negra (Fig. 10E) (ver Tabla I y Fig. 6).

B. FIBRAS

Una moderada densidad de fibras inmunorreactivas fue observada en el área hipotalámica anterior, alrededor del fornix (Fig. 8B, C), núcleo central medial, área hipotalámica dorsal, área hipotalámica lateral (Fig. 9D), núcleo mamilar lateral, área hipotalámica posterior, núcleo paraventricular hipotalámico, núcleo reuniens (Fig. 7A), núcleo rhomboidens, núcleo subparafascicular, núcleo ventromedial hipotalámico (Fig. 9B), debajo del tercer ventrículo (Fig. 9E, F) y en la zona incerta (ver Tabla I y Fig. 6).

Observamos una densidad baja de fibras inmunorreactivas con CGRP en el núcleo anterior medial, núcleo arcuatus, núcleo central lateral, núcleo lateral dorsal, núcleo habenular lateral, núcleo lateral posterior, núcleo medial dorsal, núcleo mamilar medial,

núcleo paracentral, núcleo paraventricular anterior talámico, núcleo supraquiasmático, núcleo supraóptico (Fig. 7D), subtálamo, núcleo ventral anterior, núcleo ventral lateral, núcleo ventral medial, núcleo ventral posterior lateral y en el núcleo ventral posterior medial. Finalmente, unas pocas fibras con CGRP fueron observadas en el núcleo habenular medial (ver Tabla I y Fig. 6).

Figura 6. Distribución de somas y fibras con CGRP en secciones transversales del diencéfalo de *Lama pacos* desde regiones rostrales (A) a regiones caudales (K). Los somas inmunorreactivos están representados por cuadrados (densidad baja); triángulos (densidad moderada) y por círculos (densidad alta). Las fibras están representadas por líneas varicosas (escasas fibras o densidad baja), líneas continuas (densidad moderada) y líneas cruzadas (densidad alta). Para las abreviaturas: ver lista de abreviaturas en la página 49.
Barra: 0,5 cm

Figura 7. Fibras y somas con CGRP en el diencefalo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras con CGRP en el núcleo reuniens (ver Fig. 6G). Barra: 50 μm
- B. Somas con CGRP en el núcleo supraóptico (ver Fig. 6B). Barra: 100 μm
- C. Ampliación del recuadro observado en la Figura 7B (ver Fig. 6B). Barra: 50 μm
- D. Ampliación del recuadro observado en la Figura 7C (ver Fig. 6B). Barra: 50 μm
- E. Somas con CGRP en el núcleo paraventricular hipotalámico (ver Fig. 6D). Barra: 50 μm
- F. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 7E (ver Fig. 6D). Barra: 50 μm

Figura 8. Fibras y somas con CGRP en el hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Somas con CGRP en el núcleo paraventricular hipotalámico (ver Fig. 6D).
Barra: 50 μm
- B. Fibras con CGRP alrededor del fornix (éste se observa en la parte inferior derecha de la fotografía) (ver Fig. 6G). Barra: 50 μm
- C. Fibras inmunorreactivas alrededor del fornix (ver Fig. 6G). Barra: 50 μm
- D. Somas con CGRP en el área hipotalámica anterior (ver Fig. 6B). Barra: 50 μm
- E. Somas inmunorreactivos en la región situada ventralmente al fornix (ver Fig. 6H). Barra: 50 μm
- F. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 8E (ver Fig. 6H). Barra: 50 μm

Figura 9. Fibras y somas con CGRP en el hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Somas con CGRP en la región situada ventralmente al fornix (ver Fig. 6G).
Barra: 50 μm
- B. Un soma y fibras inmunorreactivas en el núcleo ventromedial hipotalámico (ver Fig. 6H). Barra: 50 μm
- C. Somas con CGRP alrededor del fornix (ver Fig. 6H). Barra: 50 μm
- D. Somas y fibras inmunorreactivas en el área hipotalámica lateral (ver Fig. 6H). Barra: 50 μm
- E. Fibras con CGRP localizadas bajo el tercer ventrículo (ver Fig. 6J). Barra: 50 μm
- F. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 9E (ver Fig. 6J). Barra: 50 μm

Figura 10. Fibras y somas con CGRP en el diencéfalo caudal de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

Somas y fibras inmunorreactivas situadas debajo del núcleo ventral posterior medial (A-D y F) (ver Fig. 6K). Somas situados sobre la sustancia negra (E) (ver Fig. 6K). Barra: 50 μm

4.3. DISTRIBUCIÓN DE LEUCINA-ENCEFALINA EN EL DIENCÉFALO DE LA ALPACA

A. SOMAS

Hemos observado una alta densidad de somas inmunorreactivos en el núcleo paraventricular hipotalámico (Fig. 12C-E, F), así como una baja densidad en el área hipotalámica lateral (Fig. 13B, C) (ver Tabla I y Fig. 11).

B. FIBRAS

Hemos encontrado una alta densidad de fibras inmunorreactivas en el área hipotalámica anterior (Fig. 12A, B), núcleo arcuatus, área hipotalámica dorsal (Fig. 13F), alrededor del fornix, núcleo habenular lateral (Fig. 14E, F), eminencia media (Fig. 14A, B), núcleo paraventricular hipotalámico (Fig. 12C), núcleo supraquiasmático, núcleo supraóptico, núcleo ventromedial hipotalámico, así como una densidad moderada de fibras con leucina-encefalina en el núcleo arcuatus (Fig. 14C, D), núcleo central medial, área hipotalámica lateral (Fig. 13A), área hipotalámica posterior, núcleo paraventricular anterior talámico (Fig. 13D, E), núcleo subparafascicular, en la zona ventral del núcleo habenular lateral y en la zona incerta (ver Tabla I y Fig. 11).

Observamos una baja densidad de fibras inmunorreactivas en el núcleo central medial, núcleo mamilar lateral, núcleo medial dorsal, núcleo mamilar medial, núcleo reuniens y en el núcleo rhomboidens. Finalmente, algunas fibras con leucina-encefalina fueron observadas en el subtálamo (ver Tabla I y Fig. 11).

Figura 11. Distribución de somas y fibras con leucina-encefalina en secciones transversales del diencéfalo de *Lama pacos* desde regiones rostrales (**A**) a regiones caudales (**K**). Los somas inmunorreactivos están representados por cuadrados (baja densidad alta); triángulos (densidad moderada) y por círculos (densidad alta). Las fibras están representadas por líneas varicosas (escasas fibras o densidad baja), líneas continuas (densidad moderada) y líneas cruzadas (densidad alta). Para las abreviaturas: ver lista de abreviaturas en la página 49. Barra: 0,5 cm

Figura 12. Fibras y somas con leucina-encefalina en el hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras con leucina-encefalina en el área hipotalámica anterior (ver Fig. 11A). Barra: 50 μm
- B. Fibras inmunorreactivas en el área hipotalámica anterior (ver Fig. 11A). Barra: 50 μm
- C. Somas inmunorreactivos en el núcleo paraventricular hipotalámico (ver Fig. 11B). Esta foto es ampliación del recuadro superior que aparece en la Figura 12D. Barra: 50 μm
- D. Somas y fibras inmunorreactivas en el núcleo paraventricular hipotalámico (ver Fig. 11B). Barra: 50 μm
- E. Somas inmunorreactivos en el núcleo paraventricular hipotalámico (ver Fig. 11B). Esta foto es ampliación del recuadro inferior que aparece en la Figura 12D. Barra: 50 μm
- F. Somas inmunorreactivos en el núcleo paraventricular hipotalámico (ver Fig. 11B). Barra: 50 μm

Figura 13. Fibras y somas con leucina-encefalina en el diencéfalo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras localizadas en el área hipotalámica lateral (ver Fig. 11H). Barra: 50 μm
- B. Soma localizado en el área hipotalámica lateral (ver Fig. 11H). Barra: 50 μm
- C. Soma localizado en el área hipotalámica lateral (ver Fig. 11H). Barra: 50 μm
- D. Fibras con leucina-encefalina en el núcleo paraventricular anterior talámico (ver Fig. 11B). Barra: 50 μm
- E. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 13D (ver Fig. 11B). Barra: 50 μm
- F. Fibras inmunorreactivas en el área hipotalámica dorsal (ver Fig. 11E). Barra: 50 μm

Figura 14. Fibras con leucina-encefalina en el diencefalo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras en la eminencia media (ver Fig. 11H). Barra: 50 μm
- B. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 14A (ver Fig. 11H). Barra: 50 μm
- C. Fibras en el núcleo arcuatus (ver Fig. 11H). Barra: 50 μm
- D. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 14C (ver Fig. 11H). Barra: 50 μm
- E. Fibras en el núcleo habenular lateral (ver Fig. 11I). Barra: 50 μm
- F. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 14E (ver Fig. 11I). Barra: 50 μm

4.4. DISTRIBUCIÓN DE SOMATOSTATINA EN EL DIENCÉFALO DE LA ALPACA

A. SOMAS

Una alta densidad de somas inmunorreactivos fue observada en el área hipotalámica lateral (Figs. 19C-F; 20A-F) y una baja densidad de somas con somatostatina en el núcleo arcuatus y en el núcleo ventromedial hipotalámico (ver Tabla I y Fig. 15).

B. FIBRAS

Existe una alta densidad de fibras inmunorreactivas en el área hipotalámica anterior (Fig. 17E, F), núcleo arcuatus (Fig. 18C, D), núcleo central medial (Fig. 16E), área hipotalámica dorsal (Fig. 16F), alrededor del fornix (Fig. 17C, D), núcleo lateral dorsal, área hipotalámica lateral (Figs. 19D, E; 20A-F), núcleo habenular lateral (Fig. 16C, D), núcleo mamilar lateral (Fig. 19B), núcleo medial dorsal, área hipotalámica posterior (Fig. 18F), núcleo paraventricular anterior talámico (Fig. 16B), núcleo pariventricular hipotalámico (Fig. 17A, B), núcleo reuniens (Fig. 16A), núcleo rhomboidens, núcleo supraquiasmático, núcleo supraóptico (Fig. 18E), núcleo subparafascicular, núcleo ventromedial hipotalámico (Fig. 18A, B) y sobre el núcleo mamilar medial (Fig. 19A)(ver Tabla I y Fig. 15).

Una densidad media de fibras inmunorreactivas fue observada en el núcleo anterior medial, núcleo central lateral, núcleo paracentral, núcleo reticular talámico, subtálamo, núcleo ventral anterior, núcleo ventral lateral, núcleo ventral medial, núcleo ventral posterior lateral, núcleo ventral posterior medial y en la zona incerta (ver Tabla I y Fig. 15). También, observamos una densidad baja de fibras inmunorreactivas en el

núcleo anterior dorsal, núcleo anterior ventral, núcleo lateral posterior, núcleo habenular medial y en el núcleo mamilar medial (ver Tabla I y Fig.15).

Figura 15. Distribución de somas y fibras con somatostatina en secciones transversales del diencéfalo de *Lama pacos* desde regiones rostrales (**A**) a regiones caudales (**K**). Los somas inmunorreactivos están representados por cuadrados (baja densidad alta); triángulos (densidad moderada) y por círculos (densidad alta). Las fibras están representadas por líneas varicosas (escasas fibras o densidad baja), líneas continuas (densidad moderada) y líneas cruzadas (densidad alta). Para las abreviaturas: ver lista de abreviaturas en la página 49. Barra: 0,5 cm

Figura 16. Fibras con somatostatina en el diencefalo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras inmunorreactivas en el núcleo reuniens (ver Fig. 15F). Barra: 50 μm
- B. Fibras en el núcleo paraventricular anterior talámico (ver Fig. 15F). Barra: 50 μm
- C. Fibras en el núcleo habenular lateral (ver Fig. 15I). Barra: 100 μm
- D. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 16C (ver Fig. 15I). Barra: 50 μm
- E. Fibras con somatostatina en el núcleo central medial (ver Fig. 15G). Barra: 50 μm
- F. Fibras con somatostatina en el área hipotalámica dorsal (ver Fig. 15F). Barra: 50 μm

Figura 17. Fibras con somatostatina en el hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras inmunorreactivas en el núcleo paraventricular hipotalámico (ver Fig. 15B). Barra: 100 μm
- B. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 17A (ver Fig. 15B). Barra: 50 μm
- C. Fibras alrededor del fornix (ver Fig. 15B). Barra: 100 μm
- D. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 17C (ver Fig. 15B). Barra: 50 μm
- E. Fibras con somatostatina en el área hipotalámica anterior (ver Fig. 15B). Barra: 100 μm
- F. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 17E (ver Fig. 15B). Barra: 50 μm

Figura 18. Fibras con somatostatina en el hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras inmunorreactivas en el núcleo ventromedial hipotalámico (ver Fig. 15F).
Barra: 100 μm
- B. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 18A (ver Fig. 15F). Barra: 50 μm
- C. Fibras en el núcleo arcuatus (ver Fig. 15F). Barra: 100 μm
- D. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 18C (ver Fig. 15F). Barra: 50 μm
- E. Fibras con somatostatina en el núcleo supraóptico (ver Fig. 15C). Barra: 50 μm
- F. Fibras inmunorreactivas en el área hipotalámica posterior (ver Fig. 15I). Barra: 50 μm

Figura 19. Fibras y somas con somatostatina en el diencefalo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras inmunorreactivas localizadas sobre el núcleo mamilar medial (ver Fig. 15J). Barra: 50 μm
- B. Fibras con somatostatina en el núcleo mamilar lateral (ver Fig. 15J). Barra: 50 μm
- C. Fibras y somas en el área hipotalámica lateral (ver Fig. 15B). Barra: 50 μm
- D. Ampliación del recuadro izquierdo que aparece en la Figura 19C (ver Fig. 15B). Barra: 50 μm
- E. Ampliación del recuadro derecho que aparece en la Figura 19C (ver Fig. 15B). Barra: 50 μm
- F. Somas inmunorreactivos en el área hipotalámica lateral (ver Fig. 15F). Barra: 50 μm

Figura 20. Fibras y somas con somatostatina en el hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras y somas inmunorreactivos localizados en el área hipotalámica lateral (ver Fig. 15B). Barra: 100 μm
- B. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 20A (ver Fig. 15B). Barra: 50 μm
- C. Fibras y somas en el área hipotalámica lateral (ver Fig. 15B). Barra: 100 μm
- D. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 20C (ver Fig. 15B). Barra: 50 μm
- E. Somas y fibras localizadas en el área hipotalámica lateral (ver Fig. 15F). Barra: 50 μm
- F. Fibras y somas inmunorreactivos en el área hipotalámica lateral (ver Fig. 15B). Barra: 50 μm

4.5. DISTRIBUCIÓN DE NEUROTENSINA EN EL DIENCÉFALO DE LA ALPACA

A. SOMAS

Observamos una moderada densidad de somas inmunorreactivos alrededor del fornix (Fig. 25A-C) y sobre el núcleo mamilar medial (Fig. 26F) y una densidad baja de somas con neurotensina en el área hipotalámica anterior (Fig. 24C, D), área hipotalámica dorsal (Fig. 25F), área hipotalámica lateral (Fig. 23C, D), núcleo supraquiasmático (Figs. 22F; 24A, B), núcleo ventromedial hipotalámico (Fig. 26A, B), junto al tercer ventrículo (Fig. 26C) y en la zona incerta (ver Tabla I y Fig. 21).

B. FIBRAS

Hemos observado una densidad alta de fibras inmunorreactivas en el área hipotalámica anterior (Figs. 23E, F; 24A, B), núcleo central medial (Fig. 22B), área hipotalámica dorsal (Fig. 25D-F), alrededor del fornix (Figs. 23A, B; 25A-C), área hipotalámica lateral (Fig. 23C, D), núcleo mamilar lateral, eminencia media, área hipotalámica posterior (Fig. 26D, E), núcleo paraventricular hipotalámico (Fig. 24E, F), núcleo reuniens (Fig. 22A), núcleo rhomboidens (Fig. 22C), núcleo reticular talámico, núcleo supraquiasmático (Figs. 22F; 24B), núcleo subparafascicular, núcleo ventromedial hipotalámico (Fig. 26A, B) y en la zona incerta (ver Tabla I y Fig. 21).

Una densidad moderada de fibras con neurotensina fue observada en el núcleo anterior dorsal, núcleo arcuatus y en el núcleo paraventricular anterior talámico (Fig. 22D), así como encontramos una densidad baja de fibras inmunorreactivas en el núcleo anterior medial, núcleo anterior ventral, núcleo central lateral, núcleo lateral dorsal,

núcleo habenular lateral, núcleo lateral posterior, núcleo medial dorsal (Fig. 22E), eminencia media, núcleo paracentral, núcleo reticular talámico, núcleo ventral anterior, núcleo ventral lateral y en el núcleo ventral medial (ver Tabla I y Fig. 21).

Finalmente, algunas fibras con neurotensina fueron observadas en el núcleo habenular medial, núcleo mamilar medial, núcleo paracentral, núcleo supraóptico, subtálamo, núcleo ventral posterior lateral y en el núcleo ventral posterior medial (ver Tabla I y Fig. 21).

Figura 21. Distribución de somas y fibras con neurotensina en secciones transversales del diencéfalo de *Lama pacos* desde regiones rostrales (A) a regiones caudales (K). Los somas inmunorreactivos están representados por cuadrados (baja densidad); triángulos (densidad moderada) y por círculos (densidad alta). Las fibras están representadas por líneas varicosas (escasas fibras o densidad baja), líneas continuas (densidad moderada) y líneas cruzadas (densidad alta). Para las abreviaturas: ver lista de abreviaturas en la página 49. Barra: 0,5 cm

Figura 22. Fibras con neurotensina en el tálamo e hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras inmunorreactivas localizadas en el núcleo reuniens (ver Fig. 21B). Barra: 50 μm
- B. Fibras en el núcleo central medial (ver Fig. 21C). Barra: 50 μm
- C. Fibras en el núcleo rhomboidens (ver Fig. 21D). Barra: 50 μm
- D. Fibras en el núcleo paraventricular anterior talámico (ver Fig. 21F). Barra: 50 μm
- E. Fibras localizadas en el núcleo medial dorsal (ver Fig. 21H). Barra: 50 μm
- F. Fibras y somas inmunorreactivos en el núcleo supraquiasmático (ver Fig. 21B). Barra: 50 μm

Figura 23. Fibras y somas con neurotensina en el hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras inmunorreactivas alrededor del fornix (ver Fig. 21A). Barra: 100 μm
- B. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 23A (ver Fig. 21A). Barra: 50 μm
- C. Un soma y fibras en el área hipotalámica lateral (ver Fig. 21B). Barra: 50 μm
- D. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 23C (ver Fig. 21B). Barra: 50 μm
- E. Fibras localizadas en el área hipotalámica anterior (ver Fig. 21B). Barra: 50 μm
- F. Fibras en el área hipotalámica anterior (ver Fig. 21B). Barra: 50 μm

Figura 24. Fibras y somas con neurotensina en el hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Somas inmunorreactivos en el núcleo supraquiasmático (ver Fig. 21B). Barra: 100 μm
- B. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 24A (ver Fig. 21B). Barra: 50 μm
- C. Soma en el área hipotalámica anterior (ver Fig. 21B). Barra: 50 μm
- D. Somas y fibras inmunorreactivas localizadas en el área hipotalámica anterior (ver Fig. 21A). Barra: 50 μm
- E. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 24F (ver Fig. 21D). Barra: 50 μm
- F. Fibras localizadas en el núcleo paraventricular hipotalámico (ver Fig. 21D). Barra: 100 μm

Figura 25. Fibras y somas con neurotensina en el hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Somas y fibras inmunorreactivas alrededor del fornix (ver Fig. 21F). Barra: 100 μm
- B. Ampliación del recuadro superior que aparece en la Figura 25A (ver Fig. 21F). Barra: 50 μm
- C. Ampliación del recuadro inferior que aparece en la Figura 25A (ver Fig. 21F). Barra: 50 μm
- D. Fibras inmunorreactivas localizadas en el área hipotalámica dorsal (ver Fig. 21F). Barra: 100 μm
- E. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 25D (ver Fig. 21F). Barra: 50 μm
- F. Un soma y fibras inmunorreactivas localizadas en el área hipotalámica dorsal (ver Fig. 21F). Barra: 50 μm

Figura 26. Fibras y somas con neurotensina en el hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 26B (ver Fig. 21F). Barra: 50 μm
- B. Somas y fibras inmunorreactivas en el núcleo ventromedial hipotalámico (ver Fig. 21F). Barra: 50 μm
- C. Soma y fibras inmunorreactivas localizadas junto al tercer ventrículo (ver Fig. 21H). Barra: 50 μm
- D. Fibras inmunorreactivas en el área hipotalámica posterior (ver Fig. 21I). Barra: 100 μm
- E. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 26D (ver Fig. 21I). Barra: 50 μm
- F. Un soma inmunorreactivo localizado sobre el núcleo mamilar medial (ver Fig. 21J). Barra: 50 μm

4.6. DISTRIBUCIÓN DE ACTH EN EL DIENCÉFALO DE LA

ALPACA

A. SOMAS

En el diencéfalo de la alpaca, no hemos observado somas con ACTH (ver Tabla I y Fig. 27).

B. FIBRAS

Observamos una densidad alta de fibras inmunorreactivas en el área hipotalámica anterior (Figs. 28E, F; 29A), núcleo arcuatus (Fig. 30D), alrededor del fornix (Fig. 30E), área hipotalámica posterior (Fig. 30F), núcleo paraventricular hipotalámico (Fig. 29E, F), núcleo supraquiasmático (Fig. 29C, D) y en el núcleo ventromedial hipotalámico (Fig. 30B) (ver Tabla I y Fig. 27).

Una densidad moderada de fibras con ACTH fue observada en el área hipotalámica dorsal (Fig. 30C), área hipotalámica lateral (Fig. 30A), núcleo paraventricular anterior talámico (Fig. 28D), núcleo reuniens (Fig. 28A-C), núcleo supraóptico (Fig. 29B) y en el núcleo subparafascicular, así como encontramos una densidad baja de fibras con ACTH en el núcleo central medial, núcleo reuniens, núcleo rhomboidens y en la zona incerta (ver Tabla I y Fig. 27).

Finalmente, observamos unas pocas fibras inmunorreactivas en el núcleo habenular lateral, núcleo mamilar lateral, núcleo medial dorsal, eminencia media, núcleo mamilar medial y en el subtálamo (ver Tabla I y Fig. 27).

Figura 27. Distribución de las fibras con ACTH en secciones transversales del diencefalo de *Lama pacos* desde regiones rostrales (**A**) a regiones caudales (**J**). Las fibras están representadas por líneas varicosas (escasas fibras o densidad baja), líneas continuas (densidad moderada) y líneas cruzadas (densidad alta). Para las abreviaturas: ver lista de abreviaturas en la página 49. Barra: 0,5 cm

Figura 28. Fibras con ACTH en el tálamo e hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras con ACTH en el núcleo reuniens (ver Fig. 27B). Barra: 50 μm
- B. Fibras inmunorreactivas en el núcleo reuniens (ver Fig. 27B). Barra: 50 μm
- C. Fibras inmunorreactivas localizadas en el núcleo reuniens (ver Fig. 27C). Barra: 50 μm
- D. Fibras inmunorreactivas en el núcleo paraventricular anterior talámico (ver Fig. 27E). Barra: 50 μm
- E. Fibras en el área hipotalámica anterior (ver Fig. 27A). Barra: 100 μm
- F. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 28E (ver Fig. 27A). Barra: 50 μm

Figura 29. Fibras con ACTH en el hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras con ACTH en el área hipotalámica anterior (ver Fig. 27A). Barra: 50 μm
- B. Fibras inmunorreactivas en el núcleo supraóptico (ver Fig. 27C). Barra: 50 μm
- C. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 29D (ver Fig. 27A). Barra: 50 μm
- D. Fibras inmunorreactivas en el núcleo supraquiasmático (ver Fig. 27A). Barra: 100 μm
- E. Fibras en el núcleo paraventricular hipotalámico (ver Fig. 27C). Barra: 100 μm
- F. Ampliación del recuadro que aparece en la Figura 29E (ver Fig. 27C). Barra: 50 μm

Figura 30. Fibras con ACTH en el hipotálamo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las Figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos.

- A. Fibras con ACTH en el área hipotalámica lateral (ver Fig. 27B). Barra: 50 μ m
- B. Fibras inmunorreactivas en el núcleo ventromedial hipotalámico (ver Fig. 27E).
Barra: 50 μ m
- C. Fibras en al área hipotalámica dorsal (ver Fig. 27E). Barra: 50 μ m
- D. Fibras inmunorreactivas en el núcleo arcuatus (ver Fig. 27F). Barra: 50 μ m
- E. Fibras alrededor del fornix (ver Fig. 27F). Barra: 50 μ m
- F. Fibras localizadas en el área hipotalámica posterior (ver Fig. 27I). Barra: 50 μ m

V. DISCUSION

5.1 Distribución de los neuropéptidos estudiados en el diencefalo de la alpaca

Hemos de indicar que es la primera vez que se estudia la distribución de neuropéptidos en el diencefalo de la alpaca, aplicando técnicas inmunocitoquímicas. Además, previamente nuestro grupo ha realizado, también por primera vez, un estudio sobre la presencia de neuropéptidos (péptido relacionado con el gen de la calcitonina, leucina-encefalina) en el tronco del encéfalo de la alpaca, tras aplicar técnicas inmunocitoquímicas (de Souza et al., 2007a, b; 2008). Estos dos estudios son los únicos existentes en la bibliografía sobre la distribución de neuropéptidos en el sistema nervioso central de la alpaca.

Los cinco neuropéptidos que hemos estudiado mostraron una amplia distribución en el diencefalo de la alpaca. Dicha distribución es mucho mayor para las fibras que para los somas, ya que estos últimos presentaron una distribución muy reducida. Así, los somas peptidérgicos con CGRP fueron los que observamos en más núcleos diencefálicos: un total de ocho. No encontramos somas con la hormona adrenocorticotrópica.

5.1.1. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)

Hemos observado una amplia distribución de estructuras inmunorreactivas con CGRP en el diencefalo la alpaca. Todos los somas con CGRP fueron observados en el hipotálamo, destacando una densidad alta de dichos somas en el núcleo paraventricular hipotalámico y en núcleo supraóptico. De los cinco neuropéptidos estudiados en este trabajo, los somas con CGRP mostraron una distribución más amplia en el hipotálamo de la alpaca que aquellos que contienen leucina-encefalina, somatostatina o neurotensina. Sólo hemos encontrado somas peptidérgicos en el hipotálamo, ya que en

el tálamo no observamos somas inmunorreactivos. Además, los somas con CGRP son los más numerosos.

La distribución de las fibras con CGRP es muy amplia, ya que las observamos en 32 de los 36 núcleos del diencefalo de la alpaca. De los mencionados 32 núcleos, en donde encontramos fibras inmunorreactivas, en 20 de ellos observamos una densidad baja.

5.1.2. Leucina-encefalina

La presencia de estructuras inmunorreactivas con leucina-encefalina es también amplia en el diencefalo de la alpaca. Dichas distribución es muchísimo más amplia para las fibras, que para los somas, ya que estos últimos sólo fueron observados en el área hipotalámica lateral y en el núcleo paraventricular hipotalámico (alta densidad). En 22 de los 36 núcleos diencefálicos observamos fibras con leucina-encefalina; en 10 de los cuales encontramos una densidad alta de fibras inmunorreactivas (Ej., área hipotalámica anterior, núcleo arcuatus, área hipotalámica dorsal, alrededor del fornix).

La reducida distribución de somas peptidérgicos en el diencefalo de la alpaca, no sólo para la leucina-encefalina sino también para los otros neuropeptidos estudiados, se debe probablemente a que la alpaca no ha sido tratada con colchicina, ya que está bien establecido desde los años 70-80 que la administración de dicha droga, por ejemplo a nivel ventricular, es necesaria para mostrar una amplia distribución de somas peptidérgicos (Sar et al., 1978; Palkovits, 1988).

5.1.3. Somatostatina

Al igual que para los dos neuropeptidos anteriores, hemos encontrado una amplia distribución de estructuras inmunorreactivas con somatostatina en el diencefalo de *Lama pacos*. Y al igual que para el CGRP y la leucina-encefalina, la distribución de las

fibras con CGRP es mucho más amplia que la presencia de somas inmunorreactivos. Así, sólo observamos somas con somatostatina en tres núcleos hipotalámicos: arcuatus, área hipotalámica lateral (alta densidad) y en el ventromedial hipotalámico. Sin embargo, fibras con somatostatina fueron observadas en 35 de los 36 núcleos del diencefalo de la alpaca. De esos 35 núcleos, en 19 observamos una densidad alta de fibras con somatostatina (Ej., núcleo hipotalámico anterior, núcleo arcuatus, núcleo centro medial, núcleo dorsal anterior, núcleo hipotalámico ventromedial). Estos datos indican que la somatostatina es el neuropéptido más abundante en las fibras del diencefalo de la alpaca.

5.1.4. Neurotensina

Como en los tres casos anteriores hemos encontrado una amplia distribución de estructuras inmunorreactivas en el diencefalo de la alpaca conteniendo neurotensina. Y al igual que anteriormente, la distribución de las fibras es mucho más amplia que la distribución de los somas inmunorreactivos. De hecho, la neurotensina es el neuropéptido más ampliamente distribuido en el tronco del encéfalo, ya que en los 36 núcleos diencefálicos hemos encontrado fibras inmunorreactivas. Somas neurotensinérgicos fueron observados alrededor del fornix, en el área hipotalámica anterior, en el núcleo dorsal anterior, en el núcleo supraquiasmático, en el núcleo hipotalámico ventromedial y en el área hipotalámica lateral. Además, 16 de los 36 núcleos mostraron una densidad alta de fibras con neurotensina.

5.1.5. Hormona adrenocorticotrópica (ACTH)

De los cinco neuropéptidos estudiados es el único en donde no hemos observados somas inmunorreactivos. Sin embargo, la distribución de las fibras es amplia aunque sin llegar a la distribución que presentaban las fibras con neurotensina o con somatostatina. Así, de los 36 núcleos diencefálicos en 22 de ellos encontramos fibras, pero hay que

resaltar que en 6 de los 22 observamos sólo algunas fibras inmunorreactivas. Por el contrario, una densidad alta de fibras marcadas fue observada en 7 núcleos diencefálicos (ej., anterior hipotalámico, arcuatus, área hipotalámica posterior, núcleo supraquiasmático).

5.2. Relación anatómica entre los cinco neuropeptidos estudiados en el diencefalo de la alpaca

En general, podemos afirmar que en la mayoría de los núcleos diencefálicos están presentes, en las fibras, cuatro o los cinco neuropeptidos estudiados. Esto indica que probablemente existe, además de una relación anatómica, una implicación funcional entre los neuropeptidos que hemos estudiado en el diencefalo de la alpaca. Lo anteriormente indicado ocurre en los siguientes centros diencefálicos: área hipotalámica anterior, núcleo arcuatus, núcleo central medial, área hipotalámica dorsal, alrededor del fornix, área hipotalámica lateral, núcleo habenular lateral, núcleo mamilar lateral, núcleo medial dorsal, área hipotalámica posterior, núcleo paraventricular anterior talámico, núcleo paraventricular hipotalámico, núcleo rhomboidens, núcleo suprachiasmático, núcleo supraóptico, núcleo subparafascicular, núcleo ventromedial hipotalámico y en la zona incerta. También, podemos decir según lo indicado anteriormente que los cinco neuropeptidos estudiados, en general, presentan una distribución bastante parecida en el diencefalo de *Lama pacos*. Es importante también resaltar que en cualquiera de los núcleos diencefálicos de la alpaca, al menos, hemos encontrado dos de los cinco neuropeptidos estudiados.

Con respecto a los somas, hemos observado que en el área hipotalámica anterior, en el área hipotalámica dorsal y alrededor del fornix hay somas con CGRP o con neurotensina. En el núcleo paraventricular hipotalámico encontramos somas con CGRP

o con leucina-encefalina, mientras que en el núcleo ventromedial hipotalámico observamos somas con CGRP, somatostatina o con neurotensina. Finalmente, en el área hipotalámica lateral hemos encontrado somas con CGRP, con leucina-encefalina, con somatostatina o con neurotensina. Estos datos indican que puede haber coexistencia de dos o más neuropéptidos en los mencionados núcleos hipotalámicos.

5.3. Comparación de la distribución de los neuropéptidos estudiados en el diencéfalo de la alpaca con otros mamíferos

En este apartado, compararemos la distribución de los cinco neuropéptidos estudiados en el diencéfalo de la alpaca con las descritas en la bibliografía en otras especies de mamíferos.

5.3.1. CGRP

Rata

Algunos autores han indicado que la observación de somas con CGRP ocurre tras administrar intraventricularmente colchicina, ya que dichos somas no se apreciaron tras aplicar técnicas inmunocitoquímicas en animales controles (no tratados con colchicina) (Skofitsch and Jacobowitz, 1985b). Sin embargo, otros autores indicaron que la colchicina no es necesaria para la visualización de somas con CGRP (Kruger et al., 1988a, b). Esto último está de acuerdo con otras publicaciones realizadas en el gato, la alpaca y en el hombre (ver de Souza et al., 2008).

Comparando la distribución de las fibras con CGRP en el diencéfalo de la alpaca y en el diencéfalo de la rata, podemos afirmar que ambas distribuciones son muy parecidas (ver Palkovits et al., 1988), aunque como es lógico existen algunas

diferencias. Así, por ejemplo, fibras con CGRP se han observado en ambas especies en el núcleo paraventricular anterior talámico, núcleo reuniens, núcleo ventral lateral, núcleo ventral posterior lateral, núcleo ventral posterior medial, núcleo paraventricular hipotalámico, núcleo supraquiasmático, núcleo mamilar lateral, área hipotalámica anterior, núcleo arcuatus, núcleo ventromedial hipotalámico y en la zona incerta. Sin embargo, en la alpaca, pero no en la rata (Palkovits et al., 1988) se han observado fibras inmunorreactivas con CGRP en el núcleo rhomboidens, área hipotalámica posterior y en el núcleo supraóptico. Por el contrario, en la rata pero no en la alpaca se han encontrado fibras con CGRP en el núcleo geniculado medial (ver Palkovits et al., 1988).

Con respecto a los somas con CGRP, los hemos encontrado en la alpaca en ocho centros diencefálicos: área hipotalámica anterior, área hipotalámica dorsal, alrededor del fornix, área hipotalámica lateral, área hipotalámica posterior, núcleo paraventricular hipotalámico, núcleo supraóptico y en el núcleo ventromedial hipotalámico. En la rata, en los mencionados centros se han descrito somas con CGRP sólo en el área hipotalámica anterior, en el núcleo paraventricular hipotalámico y alrededor del fornix (Palkovits et al., 1988). Sin embargo, en la rata, pero no en la alpaca se han observado somas con CGRP en el núcleo paraventricular anterior talámico, núcleos ventrales talámicos, núcleo geniculado medial y en el núcleo arcuatus (Palkovits et al., 1988). Estos datos indican que la distribución de los somas con CGRP en el diencefalo de la alpaca y en el de la rata es diferente. Esto puede venir determinado por la diferente metodología empleada en ambas especies (administración de colchicina en la rata, pero no en la alpaca) o bien por diferencias específicas entre la rata y la alpaca.

Alpaca

Como hemos indicado anteriormente, el primer estudio aplicando técnicas inmunocitoquímicas que se ha realizado en el sistema nervioso de la alpaca ha sido

realizado por nuestro grupo (de Souza et al., 2007a, 2008). Así, recientemente se ha publicado un estudio sobre la distribución de CGRP en el tronco del encéfalo de la alpaca (de Souza et al., 2007a, 2008). En dicho estudio sorprende la gran cantidad y la amplia distribución de somas peptidérgicos observados. Esto mismo ocurrió con otros neuropéptidos como la metionina-enkefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ o la neurokinina A en el tronco del encéfalo del hombre (Coveñas et al., 2003a, 2004). Sin embargo hay otros neuropéptidos, como puede ser la leucina-enkefalina, que generalmente sólo se acumulan en los somas neuronales cuando se administra colchicina (de Souza et al. 2007b). Esto quiere decir que hay determinados neuropéptidos (CGRP, metionina-enkefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸, neurokinina A) que sin la administración de colchicina se acumulan en los somas neuronales (Coveñas et al., 2003a, 2004; de Souza et al., 2008), mientras que otros (leucina-enkefalina, somatostatina...) (de León et al., 1991c; de Souza et al., 2007a, b) necesitan la administración de colchicina para que se acumulen, ya que en condiciones normales las vesículas con estos últimos neuropéptidos se transportan rápidamente hacia las terminaciones axonales.

5.3.2. *Leucina-enkefalina*

Rata

Generalmente, se ha estudiado más profundamente la distribución de metionina-enkefalina en el sistema nervioso de la rata que la distribución de leucina-enkefalina (Palkovits et al., 1988). Mediante radioinmunoensayo y técnicas inmunocitoquímicas se ha descrito la presencia de leucina-enkefalina o de fibras con leucina-enkefalina en el núcleo reuniens, núcleo romboidens, núcleo supraquiasmático, área hipotalámica anterior, eminencia media, alrededor del fornix, área hipotalámica posterior, núcleo paraventricular anterior talámico, núcleo mamilar medial, núcleo ventromedial hipotalámico, zona incerta, núcleo supraóptico, núcleo paraventricular hipotalámico y en núcleo arcuatus (Palkovits et al., 1988). En todos esos centros diencefálicos, hemos

observado fibras con leucina-encefalina en la alpaca. Así, la distribución de leucina-encefalina es bastante similar en ambas especies.

Con respecto a los somas peptidérgicos con leucina-encefalina hay que resaltar su presencia, en la rata, en el núcleo paraventricular anterior talámico, núcleo supraóptico y en el núcleo arcuatus (Palkovits et al., 1988). En estos tres núcleos, no hemos observado dichos somas en la alpaca. Sin embargo, en el camélido hemos descrito somas con leucina-encefalina en el área hipotalámica lateral y en el núcleo paraventricular hipotalámico que no han sido localizados en la rata (Palkovits et al., 1988). Al igual que anteriormente (CGRP), la distribución de los somas con leucina-encefalina en el diencefalo de la rata y en el diencefalo de la alpaca es bastante diferente. Esta diferencia puede ser debida, como hemos indicado anteriormente, a aspectos metodológicos o a diferencias específicas entre las dos especies.

Alpaca

Recientemente hemos publicado la distribución de somas y fibras con leucina-encefalina en el tronco del encéfalo de la alpaca (de Souza et al., 2007a, b). Tenemos que resaltar que en el diencefalo y en el tronco del encéfalo de la alpaca sólo hemos encontrado somas con leucina-encefalina en cuatro centros: dos hipotalámicos (área hipotalámica lateral, núcleo paraventricular hipotalámico) y dos troncoencefálicos (sustancia gris periacueductal; zona ventrolateral de la formación reticular protuberancial). Sin embargo, tal y como ocurre en el diencefalo la distribución de fibras con leucina-encefalina en el tronco del encéfalo de la alpaca es muy amplia. Esto indica que tienen que existir más neuronas con leucina-encefalina en el sistema nervioso central de la alpaca. Tal como hemos comentado anteriormente, al contrario que el CGRP que se acumula en numerosos somas neuronas sin la administración colchicina (de Souza et al., 2008), la administración de la droga es necesaria para poder visualizar en la alpaca más somas con leucina-encefalina.

5.3.3. Somatostatina

Hay que resaltar, antes de realizar el estudio comparativo entre las distintas especies, que en el diencéfalo de la alpaca hemos demostrado la presencia de un fragmento de la somatostatina-28 (péptido completo). Dicho fragmento es el denominado somatostatina-28 (1-12). En general, la distribución que se conoce con más detalle en el sistema nervioso central de mamíferos es la del neuropéptido completo (somatostatina-28). Por lo tanto, en la mayoría de los casos compararemos, al menos que se especifique en el texto, la distribución de la somatostatina-28 (1-12) con la que presenta la somatostatina-28.

Rata

La distribución de fibras inmunorreactivas en el diencéfalo de la alpaca y en el diencéfalo de la rata (Palkovits et al., 1988) es muy similar. Además, en ambas especies dicha distribución es muy amplia. Tanto en la rata (Palkovits et al., 1988) como en la alpaca se han descrito fibras con somatostatina en los siguientes centros: núcleo paraventricular anterior talámico, núcleo reuniens, núcleo rhomboidens, núcleo paraventricular hipotalámico, núcleo supraóptico, núcleo supraquiasmático, eminencia media, área hipotalámica anterior, núcleo arcuatus, núcleo ventromedial hipotalámico, alrededor del fornix, núcleo mamilar medial, núcleo mamilar lateral, zona incerta y subtálamo.

En la alpaca, somas con somatostatina han sido observados en tres núcleos: arcuatus, área hipotalámica lateral y ventromedial hipotalámico. En la rata, dichos somas han sido descritos en el primer y tercer núcleo mencionados anteriormente, pero no en el área hipotalámica lateral (Palkovits et al., 1988). Sin embargo, en la rata, pero no en la alpaca somas con somatostatina han sido descritos en el núcleo geniculado medial, núcleo geniculado lateral, núcleo supraquiasmático, núcleo paraventricular

hipotalámico, área hipotalámica anterior, zona incerta y en el subtálamo (Palkovits et al., 1988). Por lo tanto, la distribución de los somas con somatostatina en el diencefalo de la alpaca y en el de la rata es bastante diferente.

Gato

En el gato se ha descrito la distribución de somatostatina-28 (1-12) (de León et al., 1991c). La distribución de fibras con dicho neuropeptido en el diencefalo del gato y en el de la alpaca es muy similar. Fibras con somatostatina-28 (1-12) se describen en ambas especies por todo el hipotálamo y por el tálamo, principalmente en los núcleos de la línea media. Sin embargo, hay que resaltar una diferencia importante a nivel talámico: en el gato los núcleos más laterales (ej., núcleo ventral lateral, núcleo reticular talámico, núcleo ventral posterior lateral, núcleo ventral posterior medial, núcleo anterior medial, núcleo anterior ventral, núcleo central lateral, núcleo central medial, núcleo ventral anterior) están desprovistos de fibras con somatostatina-28 (1-12) (de León et al., 1991c), mientras que en la alpaca hemos encontrado dichas fibras en los mencionados centros talámicos.

Con respecto a los somas con somatostanina-28 (1-12) en el diencefalo del gato (de León et al., 1991c) y en el de la alpaca, se puede afirmar que la distribución es más amplia en el gato que en la alpaca. Así, en el gato somas con el mencionado neuropeptido han sido localizados en el tálamo en el núcleo lateral dorsal y en el núcleo subparafascicular (de León et al., 1991c); lo que no ocurre en la alpaca. En la alpaca hemos encontrado somas con somatostatina-28 (1-12) en el núcleo arcuatus, área hipotalámica lateral y en el núcleo ventromedial hipotalámico; sin embargo, en el gato en ninguno de los tres centros se han observado somas con somatostatina-28 (1-12) (de León et al., 1991c). En el felino, pero no en el camélido, somas con el mencionado neuropeptido se han descrito en el hipotálamo en el área hipotalámica dorsal, área hipotalámica posterior, alrededor del fornix, núcleo paraventricular hipotalámico, núcleo

supraóptico y en el núcleo supraquiasmático (de León et al., 1991c). Repetimos la conclusión a la que hemos llegado con otros neuropéptidos: la distribución de los somas con somatostatina-28 (1-12) en el diencefalo de la alpaca y en el del gato es distinta. Probablemente, esta diferencia se debe a la metodología utilizada, ya que el gato recibió colchicina a nivel del ventrículo lateral (de León et al., 1991c) y la alpaca no.

Hombre

En el hombre la presencia de somas y de fibras con somatostatina ha sido descrita, por ejemplo, en el núcleo paraventricular hipotalámico, núcleo reticular talámico, área hipotalámica lateral, alrededor del fornix, núcleo ventromedial hipotalámico y en el área hipotalámica posterior (Bennett-Clarke y Joseph, 1986). Estos datos indican que hay diferencias significativas en la distribución de los somas que contienen somatostatina en el diencefalo de la alpaca y en el del hombre. Por el contrario, la distribución de las fibras con somatostatina es bastante similar en el diencefalo de ambas especies (Bennett-Clarke y Joseph, 1986).

5.3.4. Neurotensina

Rata

Fibras con neurotensina han sido descritas en la alpaca y en la rata (Palkovits et al., 1988) en los siguientes centros diencefálicos: núcleo paraventricular anterior talámico, núcleo reuniens, núcleo rhomboidens, núcleo anterior ventral, núcleo anterior medial, núcleo paraventricular hipotalámico, área hipotalámica anterior, eminencia media, núcleo arcuatus, alrededor del fornix, área hipotalámica posterior, núcleo mamilar lateral y en la zona incerta. Así, podemos concluir que la distribución de las fibras con neurotensina en el diencefalo de la rata y en el de la alpaca es muy similar.

Somas con neurotensina han sido observados en la alpaca en seis centros hipotalámicos: área hipotalámica anterior, área hipotalámica dorsal, alrededor del

fornix, área hipotalámica lateral, núcleo supraquiasmático y en el núcleo ventromedial hipotalámico. En la rata, de los seis centros mencionados, sólo se han descrito somas con neurotensina en el área hipotalámica anterior y alrededor del fornix (Palkovits et al., 1988). En la rata, pero no en la alpaca, se han descrito somas con neurotensina en el núcleo paraventricular anterior talámico, núcleo paraventricular hipotalámico, núcleo arcuatus, zona incerta y en el área hipotalámica posterior (Palkovits et al., 1988). Como en los casos anteriores, la distribución de los somas con neurotensina es diferente en el diencefalo de la rata y en el de la alpaca.

Gato

La presencia de fibras con neurotensina ha sido descrita por todo el hipotálamo del gato (de León et al., 1991a), al igual que ocurre en la alpaca. Fibras con neurotensina se han observado en la línea media del tálamo del gato (de León et al., 1991a), tal y como ocurre en la alpaca. Sin embargo, en la alpaca hemos observado fibras neurotensinérgicas en los núcleos más laterales talámicos, algo que no ocurre en el tálamo del felino (de León et al., 1991a). Así, por ejemplo, fibras con neurotensina han sido observadas en la alpaca, pero no en el gato en los siguientes centros talámicos: núcleo lateral posterior, núcleo central lateral, núcleo paracentral, núcleo ventral posterior lateral, núcleo ventral posterior medial, núcleo ventral lateral, núcleo central lateral, núcleo ventral anterior, núcleo anterior ventral, núcleo anterior medial, núcleo reticular talámico y núcleo anterior dorsal (de León et al., 1991a).

En el gato (de León et al., 1991a) y en la alpaca, somas con neurotensina han sido visualizados en el área hipotalámica dorsal, alrededor del fornix, área hipotalámica lateral, núcleo supraquiasmático y en el núcleo ventromedial hipotalámico. Sin embargo, la distribución de los somas con neurotensina es mucho más amplia en el gato, ya que en éste pero no en la alpaca somas neurotensinérgicas han sido observados en el núcleo lateral dorsal, núcleo reuniens, área hipotalámica posterior, núcleo

arcuatus, núcleo medial dorsal, núcleo paraventricular anterior talámico y en el núcleo supraóptico (de León et al., 1991a).

Hombre

Al igual que ocurría en el gato, en el hombre se ha descrito la presencia de fibras neurotensinérgicas por todo el hipotálamo y principalmente por la línea media talámica (Mai et al., 1987). Sin embargo, en general, estos autores no describen fibras con neurotensina en los núcleos laterales talámicos; algo que sí ocurre como hemos visto más arriba en el diencéfalo de la alpaca.

Somas neurotensinérgicos han sido observados en la alpaca y en el hombre (Mai et al., 1987) alrededor del fornix, en el núcleo supraquiasmático y en el núcleo ventromedial hipotalámico. En el hombre, pero no en la alpaca, somas neurotensinérgicos fueron visualizados en el núcleo paraventricular hipotalámico (Mai et al., 1987).

5.3.5. Hormona adrenocorticotrópica (ACTH)

Hemos demostrado en el diencéfalo de la alpaca la presencia del fragmento 18-39 de la hormona adrenocorticotrópica. Muchos de los trabajos realizados sobre la ACTH muestran la distribución del péptido completo ACTH (1-39). Así, al menos que se especifique en el texto, compararemos la distribución de ACTH (18-39) con la que presenta la ACTH (1-39). Tenemos que indicar que el anticuerpo que hemos utilizado en este trabajo, aunque principalmente reconoce el fragmento, también presenta cierta reacción cruzada con el péptido completo (ver Coveñas et al., 1996c).

Rata

En la alpaca y en la rata (Palkovits et al., 1988) se han descrito, por ejemplo, fibras con ACTH en el núcleo reuniens, núcleo rhomboidens, núcleo paraventricular anterior talámico, núcleo paraventricular hipotalámico, área hipotalámica anterior,

eminencia media, núcleo arcuatus, núcleo ventromedial hipotalámico, alrededor del fornix, área hipotalámica posterior y en la zona incerta. Es decir, la distribución de las fibras que contienen ACTH es muy parecida en ambas especies.

En la rata, somas con ACTH han sido descritos en el núcleo arcuatus (Palkovits et al., 1988); sin embargo, en la alpaca no hemos observados somas con ACTH en el diencefalo.

Gato

En el gato se ha descrito la presencia de fibras y somas con ACTH (18-39) en el diencefalo (Coveñas et al., 1996c). La distribución de las fibras con ACTH (18-39) es muy parecida en el hipotálamo de la alpaca y en el del gato. Dichas fibras se distribuyen por todo el hipotálamo, así como por los núcleos de la línea media talámica. Además, ni en la alpaca, ni en el gato se observaron fibras con ACTH (18-39) en las regiones laterales talámicas (Coveñas et al., 1996c).

En el gato, somas con ACTH (18-39) han sido observados en el núcleo arcuatus y en el núcleo ventromedial hipotalámico (Coveñas et al., 1996c); sin embargo, en la alpaca no hemos encontrado somas con ACTH (18-39). Esta diferencia puede ser debida a la colchicina, ya que el gato recibió la droga intraventricularmente (Coveñas et al., 1996c), pero no así la alpaca.

Perro

Cuando comparamos la distribución de las fibras con ACTH (18-39) en el diencefalo de la alpaca con la que presenta en la misma región el perro (Pesini et al., 2004), podemos afirmar que la distribución es muy parecida en las dos especies. Así, en el perro y en la alpaca se apreciaron fibras por todo el hipotálamo y por los núcleos de la línea media del tálamo. Además, en ambas especies los núcleos talámicos laterales estaban desprovistos de tales fibras (Pesini et al., 2004).

En el diencéfalo del perro, somas con ACTH (18-39) fueron observados solamente en aquellos animales que recibieron colchicina. Dichos somas se localizaron en el núcleo arcuatus, en la región periventricular hipotalámica y en el núcleo ventromedial hipotalámico (Pesini et al., 2004). Según estos datos, las diferencias observadas en cuanto a la distribución de los somas con ACTH (18-39) en el hipotálamo de la alpaca y en el del perro se deben a la acción de la colchicina.

Hombre

Al igual que ocurre en el gato y en el perro, la distribución de las fibras con ACTH en el diencéfalo del hombre (Zaphiropoulos et al., 1991) es muy parecida a la que ocurre en el diencéfalo de la alpaca. En ambas especies las fibras inmunorreactivas se distribuyen por todo el hipotálamo y por la línea media del tálamo, mientras que los núcleos laterales talámicos no presentan fibras con ACTH (Zaphiropoulos et al., 1991). En el hombre, sí se han observado somas inmunorreactivos en el hipotálamo basal (Zaphiropoulos et al., 1991); hecho que no se ha observado en la alpaca.

5.4. Posibles acciones fisiológicas de los neuropéptidos en el diencéfalo de la alpaca

La amplia distribución de los cinco neuropéptidos estudiados en el diencéfalo de la alpaca indica que pueden estar involucrados en diferentes acciones fisiológicas, actuando como neurotransmisores, neurohormonas y/o neuromoduladores. Además, por ejemplo, la presencia de fibras con somatostatina (35 de 36 núcleos) o con neurotensina (36 de 36) en los núcleos talámicos e hipotalámicos indica una posible relación funcional entre ambos neuropéptidos que tendrá que ser aclarada en investigaciones futuras.

A continuación, atendiendo a su localización anatómica, presentamos algunos ejemplos de las posibles acciones fisiológicas en las que pueden estar involucradas los neuropeptidos estudiados en el diencefalo de la alpaca (ver Coveñas et al., 2007a). La presencia de neuropeptidos en los núcleos de la línea media del tálamo de la alpaca indica que pueden estar involucrados en aspectos motivacionales o afectivos de la información sensorial, mientras que la presencia de los neuropeptidos CGRP, leucina-encefalina, somatostatina, neurotensina y ACTH en el núcleo medial dorsal sugiere que pueden estar involucrados en la vigilancia y en la atención (Coveñas et al., 2007a). Los somas peptidérgicos presentes en el núcleo supraóptico (con CGRP) y en el núcleo paraventricular hipotalámico (con CGRP o con leucina-encefalina) indica que dichos somas pueden enviar sus proyecciones a la hipófisis, ejerciendo ambos neuropeptidos una posible acción neuroendocrina. Además, la presencia de los cinco neuropeptidos estudiados en el núcleo supraquiasmático indica que los neuropeptidos pueden estar involucrados en los ritmos circadianos y/o en procesos visuales. La presencia de fibras con neuropeptidos en el núcleo paraventricular hipotalámico (CGRP, leucina-encefalina, somatostatina, neurotensina, ACTH), en el núcleo supraóptico (los cinco neuropeptidos estudiados) y en el núcleo ventromedial hipotalámico (los cinco neuropeptidos estudiados) indica que pueden estar involucrados en el control de las neuronas presentes en el núcleo paraventricular hipotalámico, en el control de las neuronas localizadas en el núcleo supraóptico, en el comportamiento alimenticio, en mecanismos de defensa, en el control de la termogénesis y en el estrés. Estos son algunos de los ejemplos que podemos comentar a tenor de la localización anatómica de los neuropeptidos en el tálamo e hipotálamo de la alpaca. Todas las funciones propuestas tendrán que ser confirmadas en futuras investigaciones.

Esperamos que los resultados que hemos encontrado, sirvan en el futuro para profundizar en el estudio sobre la distribución de los neuropeptidos y para conocer

mejor las funciones en las que intervienen los neuropéptidos en el sistema nervioso central de la alpaca en particular y de los camélidos en general. Esperamos también que el trabajo expuesto sirva para realizar estudios comparativos posteriores en cuanto a la distribución de los neuropéptidos en alpacas que vivieron a nivel del mar o a gran altitud (alturas superiores a 3.000 m).

5.5. Investigación futura sobre los neuropéptidos en el diencéfalo de la alpaca

Desde nuestro punto de vista, para conocer mejor la distribución y las acciones fisiológicas de los neuropéptidos en el diencéfalo de la alpaca se tendrían que desarrollar en el futuro las siguientes líneas de investigación:

1. Estudiar, tras administrar colchicina, la distribución de los somas peptidérgicos con CGRP, leucina- encefalina, somatostatina, neurotensina o con ACTH
2. Estudiar la distribución de otros neuropéptidos (neuroquinina A, beta-endorfina, alfa-neo-endorfina...) no estudiados en el presente estudio
3. Estudiar mediante técnicas inmunocitoquímicas (doble o triple marcaje) la coexistencia de neuropéptidos en los diferentes núcleos hipotalámicos
4. Conocer la distribución de los receptores de neuropéptidos
5. Conocer la distribución de peptidasas
6. Estudiar, a nivel de microscopía electrónica, los contactos sinápticos peptidérgicos

7. Determinar las acciones fisiológicas de los neuropeptidos

Esperamos que los resultados descritos en este trabajo puedan ser punto de apoyo para otros investigadores (biólogos, morfólogos, bioquímicos, fisiólogos, farmacólogos, etc.) y sirvan para ampliar los conocimientos que se tienen actualmente sobre la distribución y funciones de los neuropeptidos en el diencefalo de la alpaca. La meta que nos proponemos en los próximos años es ir desarrollando las líneas de investigación planteadas anteriormente, con el fin de conocer más a fondo la distribución y las acciones de los neuropeptidos en el diencefalo de las alpacas que vivieron a gran altitud.

VI. CONCLUSIONES

1. Hemos descrito por primera vez, tras aplicar una técnica inmunocitoquímica, la distribución de fibras y/o somas con CGRP, leucina-encefalina, somatostatina, neurotensina o ACTH en el diencefalo de la alpaca
2. Hemos observado somas inmunorreactivos con CGRP, neurotensina, somatostatina o con leucina-encefalina. Dichos somas sólo se observaron en el hipotálamo. No encontramos somas con ACTH
3. De los somas peptidérgicos, los somas con CGRP presentaron la distribución más amplia (8 de 36 núcleos)
4. Las fibras peptidérgicas presentaron una amplia y similar distribución en el diencefalo de la alpaca
5. Las fibras con neurotensina fueron las que presentaron una distribución más amplia (36 de 36 núcleos)
6. La somatostatina es el neuropeptido más abundante en el diencefalo de la alpaca
7. La distribución de los somas peptidérgicos en el diencefalo de la alpaca, en general general, difiere considerablemente de la distribución observada en otras especies (rata, gato, perro, hombre). Estas diferencias pueden deberse a aspectos metodológicos

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abrams, G.M., Nilaver, G., Hoffman, D., Zimmerman, E.A., Ferin, M., Krieger, D.T., Liotta, A.S. **1980**, Immunocytochemical distribution of corticotropin (ACTH) in monkey brain. *Neurology* 30: 1106-1110.
- Aguilar L., Malmierca M.S., Coveñas R., López-Poveda E.A., Tramu G., Merchán M. **2004**, Immunocytochemical distribution of methionine-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ (Met-8) in the auditory system of the rat. *Hear. Res.* 187: 111-121.
- Aguirre, J.A., Coveñas, R., Croix, D., Alonso, J.R., Narváez, J.A., Tramu, G., González-Barón, S. **1989a**, Immunocytochemical study of angiotensin II fibres and cell bodies in the brain stem respiratory areas of the cat. *Brain Res.* 489: 311-317.
- Aguirre, J.A., Coveñas, R., Dawid-Milner, S., Alonso, J.R., García-Herdugo, G., González-Barón, S. **1989b**, Neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain stem respiratory nuclei of the cat. *Brain Res. Bull.* 23: 201-207.
- Amaral, D.G., Avendaño, C., Benoit, R. **1989**, Distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *J. Comp. Neurol.* 284: 294-313.
- Arvidsson, U., Cullheim, S., Ulfhake, B., Ramírez, V., Dagerlind, A., Luppi, P.H., Kitahama, K., Jouvét, M., Terenius, L., Aman, K., Hökfelt, T. **1992**, Distribution of enkephalin and its relation to serotonin in cat and monkey spinal cord and brain stem. *Synapse* 11: 85-104.

- Austin, M.C., Rice, P.M., Mann, J.J., Arango, V. **1995**, Localization of corticotropin releasing hormone in the human locus coeruleus and pedunculopontine tegmental nucleus: an immunocytochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience* 64: 713-727.
- Batten T.F., Lo, V.K., Maqbool, A., McWilliam, P.N. **1989**, Distribution of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the medulla oblongata of the cat, in relation to choline acetyltransferase-immunoreactive motoneurons and substance P-immunoreactive fibres. *J. Chem. Neuroanat.* 2: 163-176.
- Belda M., Coveñas R., Narváez J.A., Aguirre J.A., Tramu G. **2000**, Distribution of luteinizing hormone-releasing hormone in the upper brainstem and diencephalon of the cat: an immunocytochemical study. *Brain Res. Bull.* 51: 281-291.
- Belda, M., Coveñas, R., Narváez, J.A., Aguirre, J.A., Tramu, G. **2003**, An immunocytochemical mapping of methionine-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ in the cat brainstem. *Anat. Embryol.* 206: 399-408.
- Bennet-Clarke, C., Joseph, S.A. **1986**, Immunocytochemical localization of somatostatin in human brain. *Peptides*, 7: 877-884.

- Benoit, R., Ling, N., Bakhit, Ch., Morrison, J.H., Alford, B., Guillemin, R. **1982**, Somatostatin-28 (1-12)-like immunoreactivity in the rat. *Endocrinology* 111: 2149-2151.
- Berman, A.L. **1968**, *The Brain Stem of the Cat. A Cytoarchitectonic Atlas with Stereotaxic Coordinates*, The University of Wisconsin Press, Madison.
- Bouras, C., Taban, C., Constantinidis, J. **1984**, Mapping of enkephalin in human brain. An immunohistofluorescence study on brain from patients with senile dementia. *Neuroscience* 12: 179-190.
- Bouras, C., Magistretti, P.J., Morrison, J.H., Constantinidis, J. **1987**, An immunohistochemical study of pro-somatostatin-derived peptides in the human brain, *Neuroscience* 3: 781-800.
- Bravo, P.W., Stewart, D.R., Lasley, B.L., Fowler, M.E. **1996**, Hormonal indicators of pregnancy in llamas and alpacas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208: 2027-2030.
- Burgos, C., Aguirre, J.A., Alonso, J.R., Coveñas, R. **1988**, Immunocytochemical study of substance P-like fibres and cell bodies in the cat diencephalons. *J. Hirnfors.* 29: 651-657.
- Burnweit, C., Forssmann, W.G. **1979**, Somatostatinergic nerves in the cervical spinal cord of the monkey. *Cell Tissue Res.* 200: 83-90.

- Campbell, M.J., Lewis, D.A., Benoit, R., Morrison, J.H. **1987**, Regional heterogeneity in the distribution of somatostatin-28- and somatostatin-28₁₋₁₂-immunoreactive profiles in monkey neocortex. *J. Neurosci.* 7: 1133-1144.
- Carpenter, M.B. **1980**, *Fundamentos de Neuroanatomía*, El Ateneo, Buenos Aires.
- Cesselin, F., Hamon, M., Bourgoïn, S., Buisson, N., Vitry, F. **1982**, Presence of met-enkephalin in somatostatin-synthesizing cell line derived from the foetal mouse hypothalamus. *Neuropeptides* 2: 351-369.
- Cheng, P.Y., Liu-Chen, L.Y., Chen, C., Pickel, V.M. **1996**, Immunolabeling of Mu opioid receptors in the rat nucleus of the solitary tract: extrasynaptic plasmalemmal localization and association with Leu⁵-enkephalin. *J. Comp. Neurol.* 371: 522-536.
- Chigr, F., Najimi, M., Leduque, P., Charnay, Y., Jordan, D., Chayvialle, J.A., Tohyama, M., Kopp, N. **1989**, Anatomical distribution of somatostatin immunoreactivity in the infant brainstem. *Neuroscience* 29: 615-628.
- Conrath, M., Coveñas, R., Romo, R., Cheramy, A., Bourgoïn, S., Hamon, M. **1986**, Distribution of met-enkephalin immunoreactive fibers in the thalamus of the cat. *Neurosci. Lett.* 65: 299-303.
- Conrath-Verrier, M., Dietl, M., Arluison, M., Cesselin, F., Bourgoïn, S., Hamon, M. **1983**, Localization of met-enkephalin-like immunoreactivity within

pain-related nuclei of cervical spinal cord, brainstem and midbrain in the cat.

Brain Res. Bull. 11: 587-604.

- Conti, F., Sternini, C. **1989**, Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-positive neurons and fibers in the cat periaqueductal grey matter. Somatos. Motor Res. 6: 497-511.
- Cooper, P.E., Fernstrom, M.H., Rorstad, O.P., Leeman, S.E., Martin, J.B. **1981**, The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. Brain Res. 218: 219-232.
- Correa, J.E., Ratto, M.H., Gatica, R. **1997**, Superovulation in llamas (*Lama glama*) with pFSH and equine chorionic gonadotrophin used individually or in combination. Anim. Reprod. Sci. 46: 289-296.
- Coveñas, R., Romo, R., Cheramy, A., Cesselin, F., Conrath, M. **1986**, Immunocytochemical study of enkephalin-like cell bodies in the thalamus of the cat. Brain Res. 377: 355-361.
- Coveñas, R., Burgos, C., Conrath, M. **1988**, Immunocytochemical study of met-enkephalin-like cell bodies in the cat hypothalamus. Neurosci. Res. 5: 353-360.
- Coveñas, R., Alonso, J.R., Tramu, G. **1989a**, Immunocytochemical study of angiotensin II cell bodies in the rat thalamus. Brain Res. 481: 185-189.

- Coveñas, R., Alonso, J.R., Conrath, M. **1989b**, Immunocytochemical study of enkephalin-like cell bodies in the thalamus of the rat. *Brain Res. Bull.* 23: 277-281.
- Coveñas, R., Aguirre, J.A., Alonso, J.R., Dios, M., Lara, J., Aijón, J. **1990a**, Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactive fibers in the cat thalamus. *Peptides* 11: 45-50.
- Coveñas, R., Aguirre, J.A., de León, M., Alonso, J.R., Narváez, J.A., Arévalo, R., González-Barón, S. **1990b**, Immunocytochemical study of neuropeptide Y-like cell bodies and fibers in the brainstem of the cat. *Brain Res. Bull.* 25: 675-683.
- Coveñas, R., Fuxe, K., Cintra, A., Aguirre, J.A., Goldstein, M., Ganten, D. **1990c**, Evidence for the existence of angiotensin II-like immunoreactivity in subpopulations of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the A₁ and C₁ area of the ventral medulla of the male rat. *Neurosci. Lett.* 114: 160-166.
- Coveñas, R., de León, M., Cintra, A., Bjelke, B., Gustafsson, J-A-. Fuxe, K. **1993**, Coexistence of c-fos and glucocorticoid receptor immunoreactivities in the CRF immunoreactive neurons of the paraventricular hypothalamic nucleus of the rat after acute immobilization stress. *Neurosci. Lett.* 149: 149-152.
- Coveñas, R., de León, M., Chadi, G., Cintra, A., Gustafsson, J-A., Narváez, J. A., Fuxe, K. **1994**, Adrenalectomy increases the number of substance P and

somatostatin immunoreactive nerve cells in the rat lumbar dorsal root ganglia.

Brain Res. 640: 352- 356.

- Coveñas, R., de León, M., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1996a**, An immunocytochemical mapping of beta-endorphin (1-27) in the cat diencephalon. *Neuropeptides* 30: 261-271.
- Coveñas, R., de León, M., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1996b**, Mapping of alpha-melanocyte-stimulating hormone-like immunoreactivity in the cat diencephalon. *Peptides* 17: 845-852.
- Coveñas, R., de León, M., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1996c**, An immunocytochemical mapping of ACTH/CLIP in the cat diencephalon. *J. Chem. Neuroanat.* 11: 191-197.
- Coveñas, R., de León, M., Narváez, J.A., Aguirre, J.A., Tramu, G., González-Barón, S. **1997**, ACTH/CLIP immunoreactivity in the cat brain stem. *Peptides* 18: 965-970.
- Coveñas, R., de León, M., Narváez, J.A., Aguirre, J.A., Tramu, G., González-Barón, S. **1999**, Anatomical distribution of beta-endorphin (1-27) in the cat brainstem: an immunocytochemical study. *Anat. Embryol.* 199: 161-167.
- Coveñas R., de León M., Narváez J.A., Aguirre J.A., Tramu G. **2000**, Mapping of alpha-melanocyte-stimulating hormone-like immunoreactivity in the cat brainstem. *Arch. Ital. Biol.* 138: 185-194.

- Coveñas, R., de León, M., Belda, M., Marcos, P., Narváez, J.A., Aguirre, J.A., Tramu, G., González-Barón, S. **2001**, Neuropeptides in the cat diencephalon: I. Thalamus. *Eur. J. Anat.* 5: 159-169.
- Coveñas, R., de León, M., Belda, M., Marcos, P., Narváez, J.A., Aguirre, J.A., Tramu, G., González-Barón, S. **2002**, Neuropeptides in the cat diencephalon: II. Hypothalamus. *Eur. J. Anat.* 6: 47-57.
- Coveñas, R., Martín, F., Belda, M., Smith, V., Salinas, P., Rivada, E., Díaz-Cabiale, Z., Narváez, J.A., Marcos, P., Tramu, G., González-Barón, S. **2003a**, Mapping of neurokinin-like immunoreactivity in the human brainstem. *BMC Neuroscience* 4: 3.
- Coveñas, R., Belda, M., Marcos, P., de León, M., Narváez, J.A., Aguirre, J.A., Tramu, G., González-Barón S. **2003b**, Neuropeptides in the cat brainstem. *Curr. Topics Peptide & Protein Res* 5: 41-61.
- Coveñas, R., Martín, F., Salinas, P., Rivada, E., Smith, V., Aguilar, L.A., Díaz-Cabiale, Z., Narváez, J.A., Tramu, G. **2004**, An immunohistochemical mapping of methionine-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ in the human brainstem. *Neuroscience* 128: 843-859.
- Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. **2007a**, Introduction to neuropeptides. En: *Focus on Neuropeptide Research*. Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 1-26.

- Coveñas, R., Mangas, A., Belda, M., Díaz-Cabiale, Z., Narváez, J.A. **2007b**, Neuropeptides in the cat diencephalon. En: Focus on Neuropeptide Research. Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 115-141.
- Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. **2007c**, Pathophysiology of neuropeptides. En: Focus on Neuropeptide Research. Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 241-272.
- Coveñas, R., Duque, E., Mangas, A., Marcos, P., Narváez, J.A. **2008**, Neuropeptides in the monkey (*Macaca fascicularis*) brainstem. En: Brain Molecules: from Vitamins to Molecules for Axonal Guidance. Mangas, A., Coveñas, R., Geffard, M. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 131-156.
- Cuadrado I., Coveñas R., Aguilar L.A., Aguirre J.A., Rioja J., Narváez J.A. **2005**, Mapping of neurokinin B in the cat brainstem. *Anat. Embryol.* 210: 133-143.
- de León, M., Coveñas, R., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1991a**, Neurotensin-like immunoreactivity in the diencephalon of the adult male cat. *Peptides* 12: 257-264.

- de León, M., Coveñas, R., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1991b**, Distribution of neurotensin-like immunoreactive cell bodies and fibers in the brainstem of the adult male cat. *Peptides* 12: 1201-1209.
- de León, M., Coveñas, R., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1991c**, Somatostatin-28 (1-12)-like immunoreactivity in the cat diencephalon. *Neuropeptides* 19: 107-117.
- de León, M., Coveñas, R., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1992a**, Distribution of somatostatin-28 (1-12) in the cat brainstem: an immunocytochemical study. *Neuropeptides* 21: 1-11.
- de León, M., Coveñas, R., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1992b**, Distribution of cholecystokinin octapeptide in the cat brainstem: an immunocytochemical study. *Arch. Ital. Biol.* 130: 1-10.
- de León, M., Coveñas, R., Chadi, G., Narváez, J.A., Fuxe, K., Cintra, A. **1994**, Subpopulations of primary sensory neurons show coexistence of neuropeptides and glucocorticoid receptors in the rat spinal and trigeminal ganglia. *Brain Res.* 636: 338-342.
- de Souza, E. **2007a**, Distribución de neuropéptidos en el tronco del encéfalo de la alpaca (*Lama pacos*): estudio inmunocitoquímico. Trabajo de Grado, Universidad de Salamanca.

- de Souza, E., Yi, P., Aguilar, L.A., Coveñas, R., Lerma, L., Andrade, R., Mangas, A., Narváez, J.A. **2007b**, Mapping of leucine-enkephalin in the alpaca (*Lama pacos*) brainstem. En: Focus on Neuropeptide Research. Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 103-113.
- de Souza, E., Coveñas, R., Yi, P., Aguilar, L.A., Lerma, L., Andrade, R., Mangas, A., Díaz-Cabiale, Z., Narváez, J.A. **2008**, Mapping of CGRP in the alpaca (*Lama pacos*) brainstem. *J. Chem. Neuroanat.* 35: 346-355.
- Díaz-Cabiale, Z., Parrado, C., Coveñas, R., Rodríguez, M., Fuxe, K., Narváez, J.A. **2008**, Galanin in the central nervous system. En: Brain Molecules: from Vitamins to Molecules for Axonal Guidance. Mangas, A., Coveñas, R., Geffard, M. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 157-180.
- Di Figlia, M., Aronin, N. **1984**, Immunoreactive leu-enkephalin in the monkey hypothalamus including observations on its ultrastructural localization in the paraventricular nucleus. *J. Comp. Neurol.* 255: 313-326.
- Elde, R., Hökfelt, T., Johansson, O., Terenius, L. **1976**, Immunohistochemical studies using antibodies to leucine-enkephalin: initial observations on the nervous system of the rat. *Neuroscience* 1: 349-351.
- Edwards, D.L., Poletti, C.E., Foote, W.E. **1987**, Evidence for leucine-enkephalin- immunoreactive neurons in medulla which project to spinal cord in squirrel monkey. *Brain Res.* 437: 197-203.

- Fabri, M., Conti, F. **1990**, Calcitonin gene-related peptide-positive neurons and fibers in the cat dorsal nuclei. *Neuroscience* 34: 167-174.
- Finley, J.C.W., Maderdrut, L.J., Petrusz, P. **1981**, The immunohistochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 6: 2173-2192.
- Fuxe, K., Aguirre, J.A., Agnati, L.F., von Euler, G., Hedlund, P., Coveñas, R., Zoli, M., Bjelke, B. **1990**, Neuropeptide Y and central cardiovascular regulation. Focus on its role as a cotransmitter in cardiovascular adrenergic neurons. *Ann. NY Acad. Sci.* 611: 111-132.
- Goedert, M., Emson, P.C. **1983**, The regional distribution of neurotensin-like immunoreactivity in central and peripheral tissues of the cat. *Brain Res.* 272: 291-297.
- Graybiel, A.M., Elde, R.P. **1983**, Somatostatin-like immunoreactivity characterizes neurons of the nucleus reticularis thalami in the cat and monkey. *J. Neurosci.* 3: 1308-1321.
- Guy, J., Benoit, R., Pelletier, G. **1985**, Immunocytochemical localization of somatostatin-28 (1-12) in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 330: 283-289.

- Haber, S., Elde, R. **1982a**, The distribution of enkephalin-immunoreactive neuronal cell bodies in the monkey brain: preliminary observation. *Neurosci. Lett.* 32: 247-252.
- Haber, S., Elde, R. **1982b**, The distribution of enkephalin-immunoreactive fibers and terminals in the monkey central nervous system: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 7: 1049-1095.
- Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Luft, R., Arimura, A. **1974**, Immunohistochemical localization of somatostatin (growth hormone release-inhibiting factor) in the guinea-pig brain. *Brain Res.* 80: 165-169.
- Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Terenius, L., Stein, L. **1977**, The distribution of enkephalin-immunoreactive cell bodies in the rat central nervous system. *Neurosci. Lett.* 5: 25-31.
- Ibuki, T., Okamura, H., Miyazaki, M., Yanaihara, N., Zimmerman, E.A., Ibata, Y. **1989**, Comparative distribution of the three opiod systems in the lower brainstem of the monkey (*Macaca fuscata*). *J. Comp. Neurol.* 279: 445-456.
- Inagaki, S., Parent, A. **1985**, Distribution of enkephalin-immunoreactive neurons in the forebrain and the upper brainstem of the Squirrel Monkey. *Brain Res.* 359: 267-280.
- Iritani, S., Satoh, K. **1991**, Distribution of somatostatin-immunoreactive cell bodies and fibers in the neocortex of *Macaca fuscata*. *Synapse* 9: 50-59.

- Johansson, O., Hökfelt, T., Elde, R.P. **1984**, Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience* 13: 265-339.
- Kataoka, K., Mizuno, N. y Frohman, L.A. **1979**, Regional distribution of immunoreactive neurotensin in monkey brain. *Brain Res. Bull.* 4: 57-60.
- Jennes, L., Stumpf, W.E., Kalivas, P.W. **1982**, Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.* 210: 211-224.
- Joseph, S.A. **1980**, Immunoreactive adrenocorticotropin in rat brain: a neuroanatomical study using antiserum generated against synthetic ACTH. *Am. J. Anat.* 158: 533-548.
- Joseph, S.A., Michael, G.J. **1988**, Efferent ACTH-ir opiocortin projections from nucleus tractus solitarius: a hypothalamic deafferentation study. *Peptides* 9: 193-201.
- Joseph, S.A., Pilcher, W.H., Bennett-Clarke, C. **1983**, Immunocytochemical localization of ACTH perikarya in nucleus tractus solitarius: evidence for a second opiocortin neuronal system. *Neurosci. Lett.* 38: 221-225.
- Kalivas, P.W., Miller, J.S. **1984**, Neurotensin neurons in the ventral tegmental area project to the medial nucleus accumbens. *Brain Res.* 300: 157-160.

- Kawai, Y., Takami, K., Shiosaka, S., Emson, P.C., Hillyard, C.J., Girgis, S., MacIntyre, I., Tohyama, M. **1985**, Topographic localization of calcitonin gene-related peptide in the rat brain: an immunocytochemical analysis. *Neuroscience* 15: 747-763.
- Khachaturian, H., Lewis, M.E., Watson, S.J. **1983**, Enkephalin systems in diencephalons and brainstem of the rat. *J. Comp. Neurol.* 220: 310-320.
- Khachaturian, H., Lewis, M.E., Haber S.N., Akil, H. y Watson, S.J. **1984**, Proopiomelanocortin peptide immunocytochemistry in rhesus monkey brain. *Brain Res. Bull.* 13: 785-800.
- Khachaturian, H., Lewis, M.E., Tsou, K., Watson, S.J. **1985a**, Beta-endorphin, alpha-MSH, ACTH and related peptides. En: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, vol. 4, Björklund, A. y Hökfelt, T. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 216-272.
- Khachaturian, H., Lewis, M.E., Haber, S.N., Houghten, R.A., Akil, H., Watson, S.J. **1985b**, Prodynorphin peptide immunocytochemistry in rhesus monkey brain. *Peptides* 6: 155-166.
- Kitahama, K., Sakai, K., Jouvét, M., Dubois, P. **1984**, Mise en évidence de la projection directe des neurones immunoreactifs à l'ACTH sur le complexe du locus coeruleus chez le chat. *C. R. Acad. Sci.* III 298: 163-167.

- Kitahama, K., Sallanon, M., Buda, C., Janin, M., Dubois, M.P., Jouvét, M. **1986**, ACTH-immunoreactive neurons and their projections in the cat forebrain. *Peptides* 7: 801-807.
- Kruger, L., Mantyh, P.W., Sternini, C., Brecha, N., Mantyh, C.R. **1988a**, Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the rat central nervous system: patterns of immunoreactivity and receptor binding sites. *Brain Res.* 463: 233-244.
- Kruger, L., Sternini, C., Brecha, N., Mantyh, P. **1988b**, Distribution of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in relation to the rat central somatosensory projection. *J. Comp. Neurol.* 273: 149-162.
- Krukoff, T.L., Calaresu, F.R. **1984**, A group of neurons highly reactive for enkephalins in the rat hypothalamus. *Peptides* 5: 931-936.
- Kubek, M.J., Wilder, J.F. **1980**, Regional distribution of leucine-enkephalin in hypothalamic and extrahypothalamic loci of the human nervous system. *Neurosci. Lett.* 18: 155-161.
- Léger, L., Bonnet, C., Cespuglio, R., Jouvét, M. **1994**, Immunocytochemical study of the CLIP/ACTH-immunoreactive nerve fibres in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.* 174: 137-140.
- Léger, L., Lema, F., Chastrette, N., Charnay, Y., Cespuglio, R., Mazie, J.C., Jouvét, M. **1990**, A monoclonal antibody directed against CLIP (ACTH 18-39). Anatomical distribution of immunoreactivity in the rat brain and hypophysis

-
- with quantification of the hypothalamic cell group. *J. Chem. Neuroanat.* 3: 297-308.
- Lewis, D.A., Campbell, M.J., Morrison, J.H. **1986**, An immunohistochemical characterization of somatostatin-28 and somatostatin-28₁₋₁₂ in monkey prefrontal cortex. *J. Comp. Neurol.* 248: 1-18.
 - Loh, Y.P., Gainer, H. **1983**, Biosynthesis and processing of neuropeptides. En: *Brain Peptides*, Krieger, D.T., Brownstein, M.J., Martin J.B. (eds.), John Wiley & Sons, Nueva York, pp. 79-116.
 - Mai, J.K., Triepel, J., Metz, J. **1987**, Neurotensin in the human brain. *Neuroscience* 22: 499-524.
 - Maley, B.E., Newton, B.W., Howes, K.A., Herman, L.M., Oloff, C.M., Smith, K.C., Elde, R.P. **1987**, Immunohistochemical localization of substance P and enkephalin in the nucleus tractus solitari of the rhesus monkey *Macaca malatta*. *J. Comp. Neurol.* 260: 483-490.
 - Mangas, A., Coveñas, R., Narváez, J.A. **2007**. Functions of neuropeptides. En: *Focus on Neuropeptide Research*. Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 189-218.
 - Marcos, P., Coveñas, R., de León, M., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1993a**, Neurokinin A-like immunoreactivity in the cat brainstem. *Neuropeptides* 25: 105-114.

- Marcos, P., Coveñas, R., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1993b**, Alpha-neo-endorphin-like immunoreactivity in the cat brain stem. *Peptides* 14: 1263-1269.
- Marcos, P., Coveñas, R., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1994a**, Distribution of gastrin-releasing peptide/bombesin-like immunoreactive cell bodies and fibres in the brainstem of the cat. *Neuropeptides* 26: 93-101.
- Marcos, P., Coveñas, R., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1994b**, Distribution of dynorphin A (1-17) in the cat brainstem; an immunocytochemical study. *Arch. Ital. Biol.* 132:73-84.
- Marcos, P., Coveñas, R., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1994c**, Galanin-like immunoreactivity in the cat brainstem. *Arch. Ital. Biol.* 132: 179-189.
- Marcos, P., Corio, M., Coveñas, R., Tramu, G. **1996**, Neurotensin and tyrosine hydroxylase in the tuberoinfundibular system of the guinea pig hypothalamus with special emphasis to lactation status. *Peptides* 17: 139-146.
- Marcos, P., Corio, M., Dubourg, P., Coveñas, R., Tramu, G. **1997**, Double immunocytochemistry in pre-embedding electron microscopy for the detection of neurotensin and tyrosine hydroxylase in the guinea pig, using two primary antisera raised in the same species. *Brain Res. Brain Res. Protocols* 2: 1-8.

- Marcos, P., Coveñas, R., Narváez, J.A., Aguirre, J.A., Tramu, G., González-Barón, S. **1998**, Neuropeptides in the cat amygdale. *Brain Res. Bull.* 45: 261-268.
- Marcos, P., Coveñas, R., Narváez, J.A., Díaz-Cabiale, Z., Aguirre, J.A., Tramu, G., González-Barón, S. **1999**. Immunohistochemical mapping of enkephalins, NPY, CGRP, and GRP in the cat amygdale. *Peptides* 20: 635-644.
- Marcos, P. **2007**, Neuropeptides in the cat brainstem. En: *Focus on Neuropeptide Research*. Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 115-141.
- Martín F., Coveñas R., Narváez J.A., Tramu G. **2003**, An immunocytochemical mapping of somatostatin in the cat auditory cortex. *Arch. Ital. Biol.* 141: 157-170.
- McWilliam, P.N., Maqbool, A., Batten, T.F.C. **1989**, Distribution of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the nucleus ambiguous of the cat. *J. Comp. Neurol.* 282: 206-214.
- Moga, M.M., Gray, T.S. **1985**, Evidence for corticotropin-releasing factor, neurotensin and somatostatin in the neural pathway from the central nucleus of the amygdale to the parabrachial nucleus. *J. Comp. Neurol.* 241: 275-284.

- Morrison, J.H., Benoit, R., Magistretti, P.J., Bloom, F.E. **1983**, Immunohistochemical distribution of pro-somatostatin-related peptides in cerebral cortex. *Brain Res.* 262: 344-351.
- Mulderry, P.K., Ghatei, M.A., Bishop, A.E., Allen, Y.S., Polak, J.M., Bloom, S.R. **1985**, Distribution and chromatographic characterization of CGRP-like immunoreactivity in the brain and gut of the rat. *Regul. Pept.* 12: 133-143.
- Oertel, W.H., Graybiel, A.M., Mugnaini, R., Elde, R.P., Schechel, D.E., Kopin, I.J. **1983**, Coexistence of glutamic acid decarboxylase and somatostatin-like immunoreactivity in neurons of the feline nucleus reticularis thalami. *J. Neurosci.* 6: 1322-1332.
- Palkovits, M. **1988**, Neuropeptides in the brain. En: *Frontiers in Neuroendocrinology*, vol. 10, Martini, L. y Ganong W.F. (eds), Raven Press, Nueva York, pp. 1-44.
- Palkovits, M., Eskay, R.L. **1987**, Distribution and possible origin of beta-endorphin and ACTH in discrete brainstem nuclei of rats. *Neuropeptides* 9:123-137.
- Paxinos, G., Watson, C., **1998**, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.

- Pego-Reigosa, R., Coveñas, R., Tramu, G., Pesini, P. **2000**, Distribution of met-enkephalin immunoreactivity in the diencephalon and the brainstem of the dog. *J. Chem. Neuroanat.* 19: 243-258.
- Pego-Reigosa R., Coveñas R., Tramu G., Pesini P. **2001**, Somatostatin-28 (1-12)-like immunoreactivity in the diencephalon and the brainstem of the dog. *Anat. Embryol.* 203: 61-76.
- Pego-Reigosa, R., Insua, D., Pesini, P. **2007**. Neuropeptides in the brainstem and diencephalon of the dog. En: *Focus on Neuropeptide Research*. Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 143-166.
- Pelletier, G., Leclerc, R. **1979**, Immunohistochemical localization of adrenocorticotropin in the rat brain. *Endocrinology* 104: 1426-1433.
- Pesini, P., Pego-Reigosa, R., Tramu, G., Coveñas, R. **2001**, Distribution of alpha-neoendorphin immunoreactivity in the diencephalon and the brainstem of the dog. *J. Chem. Neuroanat.* 22: 251-262.
- Pesini, P., Pego-Reigosa, R., Tramu, G. y Coveñas, R. **2004**, Distribution of ACTH immunoreactivity in the diencephalon and the brainstem of the dog. *J. Chem. Neuroanat.* 27: 275-282.
- Quartu, M., Díaz, G., Floris, A., Lai, M.L., Prietley, J.V., Del Fiacco, M. **1992**, Calcitonin gene-related peptide in the human trigeminal sensory system at

developmental and adult life stages: immunohistochemistry, neuronal morphometry and coexistence with substance P. *J. Chem. Neuroanat.* 5: 143-157.

- Rao, J.K., Hu, H., Prasad, C., Jayaraman, A. **1986**, The distribution pattern of adrenocorticotropin-like immunoreactivity in the cat central nervous system. *Neurosci. Lett.* 71: 48-52.
- Ratto, M.H., Gatica, R., Correa, J.E. **1997**, Timing of mating and ovarian response in llamas (*Lama glama*) treated with pFSH. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 325-330.
- Ratto, M.H., Huanca, W., Singh, J., Adams, G.P. **2005**, Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3: 29.
- Ratto, M.H., Huanca, W., Singh, J., Adams, G.P. **2006**, Comparison of the effect of natural mating, LH, and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 91: 299-306.
- Reichlin, S. **1983**, Somatostatin, En: Brain peptides, Krieger, D.T., Brownstein, M.J., Martin, J.B. (eds.), John Wiley & Sons, New York, pp. 711-752.
- Romagnano, M.A., Joseph, S.A. **1983**, Immunocytochemical localization of ACTH1-39 in the brainstem of the rat. *Brain Res.* 276: 1-16.

- Samsam, M., Coveñas, R., Ahangari, R., Yajeya, J., Narváez, J.A., Tramu, G. **1999**, Alterations in neurokinin A-, substance P- and calcitonin gene-related peptide immunoreactivities in the caudal trigeminal nucleus of the rat following electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neurosci. Lett.* 261: 179-182.
- Samsam M., Coveñas R., Ahangari R., Yajeya J., Narváez J.A., Tramu G. **2000**, Simultaneous depletion of neurokinin A, substance P and calcitonin gene-related peptide from the caudal trigeminal nucleus of the rat during electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Pain* 84: 389-395.
- Samsam M., Coveñas R., Csillik B., Ahangari R., Yajeya J., Riquelme R., Narváez J.A., Tramu G. **2001**, Depletion of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide from the contralateral and ipsilateral caudal trigeminal nucleus following unilateral electrical stimulation of the trigeminal ganglion; A possible neurophysiological and neuroanatomical link to generalized head pain. *J. Chem. Neuroanat.* 21: 161-169.
- Sánchez L., Coveñas R., Aguirre J.A., Narváez J.A., Gómez A., Tramu G. **2005**, Mapping of tachykinins in the cat spinal cord. *Arch. Ital. Biol.* 143: 29-50.
- Sánchez, L., Coveñas, R., Díaz-Cabiale, Z., Narváez, J.A. **2007**, Neuropeptides in the cat spinal cord. En: *Focus on Neuropeptide Research*. Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 27-56.

- Sar, M., Stumpf, W.E., Miller, R.J., Chang, K-J., Cuatrecasas, P. **1978**, Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 182:17-37.
- Seroogy, K.B., Mehta, A., Fallon, J.H. **1987**, Neurotensin and cholecystokinin coexistence within neurons of the ventral mesencephalon: projections to forebrain. *Exp. Brain Res.* 68: 277-289.
- Skofitsch, G., Jacobowitz, D.M. **1985a**, Quantitative distribution of calcitonin gene-related peptide in the rat central nervous system. *Peptides* 6: 1069-1073.
- Skofitsch, G., Jacobowitz, D.M. **1985b**, Calcitonin gene-related peptide: detailed immunohistochemical distribution in the central nervous system. *Peptides* 6: 721-745.
- Skofitsch, G., Jacobowitz, D.M. **1985c**, Calcitonin gene-related peptide coexists with substance P in capsaicin-sensitive neurons and sensory ganglia of the rat. *Peptides* 6: 747-754.
- Sorensen, K.V. **1982**, Somatostatin: localization and distribution in the cortex and the subcortical white matter of human brain. *Neuroscience* 7: 1227-1232.
- Studler, J.M., Kitabgi, P., Tramu, G., Herve, D., Glowinski, J., Tassin, J.P. **1988**, Extensive colocalization of neurotensin with dopamine in rat meso-cortico-frontal dopaminergic neurons. *Neuropeptides* 11: 95-100.

- Takatsuki, K., Shiosaka, S., Sakanaka, M., Inagaki, S., Senba, E., Takagi, H., Tohyama, M. **1981**, Somatostatin in the auditory system of the rat. *Brain Res.* 213: 211-216.
- Tashiro, T., Takahashi, O., Satoda, T., Matsushima, R., Uemura-Sumi, M., Mizuno, N. **1991**, Distribution of axons showing calcitonin gene-related peptide- and/or substance P-like immunoreactivity in the sensory trigeminal nuclei of the cat. *Neurosci. Res.* 11: 119-133.
- Tramu, G., Beauvillain, J.C., Croix, D., Leonardelli, J. **1981**, Comparative immunocytochemical localization of enkephalin and somatostatin in the median eminence, hypothalamus and adjacent areas of the guinea-pig areas. *Brain Res.* 215: 235-255.
- Triepel, J., Weindl, A., Heinrich, D., Forsmann, W.G., Metz, J. **1984**, Distribution of neurotensin-immunoreactive perikarya in the brainstem of the guinea-pig. *Histochemistry* 13: 229-312.
- Uhl, G.R., Goodman, R.R., Snyder, S.H. **1979**, Neurotensin-containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat: immunohistochemical mapping. *Brain Res.* 167: 77-91.
- Unger, J.W., Lange, W. **1991**, Immunohistochemical mapping of neurophysins and calcitonin gene-related peptide in the human brainstem and cervical spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.* 4: 299-309.

- Vázquez, J., Coveñas, R., Muñoz, M., García, J.A., Victoria, A. **1998**, Modifications in the distribution of met-enkephalin in the cat spinal cord after administration of clonidine. An immunocytochemical study. *Histol Histopathol.* 13: 955-959.
- Velasco, A., de León, M., Coveñas, R., Marcos, P., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A., González-Barón, S. **1993**, Distribution of neurokinin A in the cat diencephalon: an immunocytochemical study. *Brain Res. Bull.* 31: 279-285.
- Villarroel, J. **1991**, Las fibras. En: *Avances y Perspectivas del Conocimiento de los Camélidos Sudamericanos*. Fernández-Baca, S. (ed.), FAO/RLA, Santiago de Chile, pp. 235-257.
- Vincent, S.R., McIntosh, A.M.J., Brown, J.C. **1985**, Central somatostatin systems revealed with monoclonal antibodies. *J. Comp. Neurol.* 238: 169-186.
- Watson, S.J., Akill, H., Sullivan, S., Barchas, J.D. **1977**, Immunocytochemical localization of methionine-enkephalin: preliminary observations. *Life Sci.* 21: 733-738.
- Watson, S.J., Khachaturian, H., Akill, H., Coy, D.H., Goldstein, A. **1982**, Comparison of the distribution of dynorphin systems and enkephalins in brain. *Science* 218: 1134-1136.

- Yamano, M., Tohyama, M., Shiosaka, S., Shiotani, Y., Inagaki, S., Kito, S. **1985**, Leucine-enkephalin-like immunoreactive fibers in the medial preóptica area of the rat: their distribution and origin. *Exp. Brain Res.* 60: 535-541.
- Zamir, N., Palkovits, M., Brownstein, M.J. **1985**, Distribution of immunoreactive met-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ and leu-enkephalin in discrete regions of the rat brain. *Brain Res.* 326: 1-8.
- Zaphiropoulos, A., Charnay, Y., Vallet, P., Constantinidis, J., Bouras, C. **1991**, Immunohistochemical distribution of corticotrophin-like intermediate lobe peptide (CLIP) immunoreactivity in the human brain. *Brain Res. Bull.* 26: 99-111.