

KAJIAN IMUNOHISTOKIMIA PERKEMBANGAN BENTUK NEURON ATEKOLAMINERGIK PADA AREA POSTREMA MONYET EKOR PANJANG (*Macaca fascicularis*)

MORPHOLOGICAL DEVELOPMENT OF CATECHOLAMINERGIC NEURONS IN THE AREA POSTREMA OF LONG-TAILED MONKEY (*Macaca fascicularis*): AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

Tri Wahyu Pangestinarsih¹, Koeswinarning Sigit², Dondin Sajuthi³, Nurhidayat², Douglas M Bowden⁴

¹Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan UGM, Yogyakarta. email: estifkh@ugm.ac.id

²Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor

³Pusat Studi Satwa Primata, LPPM-IPB, Bogor

⁴National Primate Research Center, University of Washington, Seattle, Washington. AS

ABSTRAK

Area postrema merupakan sepasang penonjolan ke dorsal pada bagian kaudal medula oblongata yang berbatasan dengan ventrikel IV. Area ini berperan sebagai *chemoreceptor trigger zone* (CTZ) pada proses muntah yang juga melibatkan neuron katekolaminergik (neuron KA). Pada kemoterapi penderita kanker, fungsi AP sebagai CTZ diupayakan untuk ditekan agar tidak ada refleks muntah pada pasien. Dalam rangka lebih memahami neuron KA tersebut, dalam penelitian ini dilakukan pengamatan perkembangan bentuk neuron KA di area postrema (AP) monyet ekor panjang (MEP) mulai fetus (F) umur 40 sampai anak (P) umur 105 hari secara imunohistokimia menggunakan antibodi terhadap enzim tirosin hidroksilase (TH). Hasil penelitian memperlihatkan neuron KA di medula oblongata belum terlihat pada F40, dan baru dijumpai pada F55 di daerah bakal AP, bentuk bulat dengan inti besar dengan sitoplasma sedikit yang merupakan ciri perkembangan awal bentuk neuron. Prosesus sitoplasma yang pendek pada mulai ditemukan pada F85, dan neuron KA di AP berubah menjadi bipolar pada F100 yang merupakan tanda perkembangan menengah bentuk neuron. Dengan bertambahnya umur, prosesus sitoplasma neuron KA bipolar bertambah panjang yang merupakan ciri tingkat perkembangan bentuk akhir dan ditemukan dominan di AP pada P105. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa neuron KA di AP pada MEP berada dalam stadium perkembangan bentuk awal dan menengah selama masa prenatal, dan stadium perkembangan lanjut menuju ke perkembangan akhir terjadi pada masa postnatal.

Kata kunci: monyet ekor panjang, area postrema, tirosin hidroksilase (TH), neuron katekolaminergik

ABSTRACT

The morphological development of catecholaminergic (CA) neurons in the area postrema (AP) of long-tailed macaques from fetal day (F) 40 to 105 days old of infant (P) was studied immunohistochemically using antibody against enzyme tyrosine hydroxylase (TH). The results show that the CA's neurons did not appear yet at F40, but found at F55 in the anlage of AP, round in shape with big nuclei and few cytoplasms. The CA neuron's morphology then becomes bipolar in shape with short cytoplasm processes at F100, and getting longer at P105. From the results we concluded that the development of CA's neurons was in the early and intermediate stages during prenatal period of the long-tailed macaques, and the development in advance was continued in the postnatal period.

Key words: long-tailed monkey, area postrema, tyrosine hydroxylase (TH), catecholaminergic neurons

PENDAHULUAN

Area postrema (AP) merupakan sepasang penonjolan agak bulat ke arah ventrikel IV yang terletak di bagian dorsal medula oblongata, berdekatan dengan medula spinalis. Bagian kaudal AP berbatasan dengan nukleus gracilis, bagian ventro-lateral berbatasan dengan nukleus traktus solitarius, sedang bagian rostral berbatasan dengan substansia nigra sentralis (Oertel, 1969). Komponen seluler AP adalah neuron berbentuk bulat atau oval, berukuran kecil, dan memiliki satu atau dua proses sitoplasma dan neuroglia. Neuroglia utama yang terdapat pada daerah AP adalah astrosit (Klara and Brizzee, 1975). Area Postrema merupakan *chemoreceptor trigger zone* (CTZ) dalam proses muntah yang peka terhadap stimulus kimiawi baik dari pembuluh darah maupun cairan otak (*cerebrospinal fluid*) (Miller and Leslie, 1994), karena pada AP terdapat neurotransmitter noradrenergik, enkefalin, substansi P (Armstrong *et al.* 1981), serotonin, L-glutamat (Hay, 2001), dopamin (Kalia *et al.*, 1985), noradrenalin (Brizzee *et al.*, 1978), serta reseptor dopamin, serotonin (Kufe *et al.*, 2003), dan *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) (Yamamoto *et al.*, 2003). Jika fungsi AP ini dapat dikendalikan, maka akan sangat membantu dalam menekan efek samping muntah pada proses kemoterapi penderita kanker, sehingga meningkatkan kesejahteraan pasien dalam menjalani terapinya.

Neuron katekolaminergik (KA) terdiri atas neuron dopaminergik, noradrenergik dan adrenergik yang tersebar mulai dari bagian kaudal sampai rostral otak mamalia (Kitahama *et al.*, 1994). Kelompok neuron KA diberi nama dengan huruf A diikuti angka arab 1 sampai 17, dimulai dari bagian paling kaudal medula oblongata menuju bagian paling rostral yaitu pada retina mata (Verney, 1999). Untuk mengetahui jenis neuron KA tersebut dopaminergik atau noradrenergik dapat dilakukan dengan melihat kandungan TH dan DBH-nya menggunakan teknik imunohistokimia.

Data perkembangan neuron KA di AP yang sangat penting bagi dunia medis hingga

saat ini ternyata belum lengkap. Sebagai contoh, neuron KA di AP ditemukan pada fetus manusia umur 14,5-25 minggu (Lorke *et al.*, 2003), tetapi pada perkembangan selanjutnya tidak ditemukan, meskipun ada dugaan sementara bahwa neuron tersebut mengalami apoptosis. Di sisi lain, neuron KA di AP tidak dijumpai pada manusia dewasa (Arango *et al.*, 1988), tetapi ditemukan pada beberapa spesies hewan seperti monyet resus dan monyet ekor panjang (MEP) (Schreihofner *et al.*, 1997), tikus (Micheli *et al.*, 1987), dan kucing (Maghood *et al.*, 1993). Selain itu, hingga kini belum ada informasi yang jelas mengenai tahap-tahap perkembangan neuron KA di AP. Mengingat pentingnya ketersediaan informasi tentang peranan neuron KA di AP dalam proses muntah, maka penelitian ini dilakukan, dengan hewan model MEP, mulai fetus umur 40 hari sampai dengan anak umur 105 hari. Selain karena kedekatan anatomis dan fisiologisnya dengan manusia, ketersediaan hewan ini masih melimpah di Indonesia sehingga cukup beralasan untuk dimanfaatkan sebagai hewan model.

Penelitian ini sendiri bertujuan untuk mempelajari pola perkembangan bentuk neuron KA di AP selama periode fetus sampai setelah lahir pada MEP.

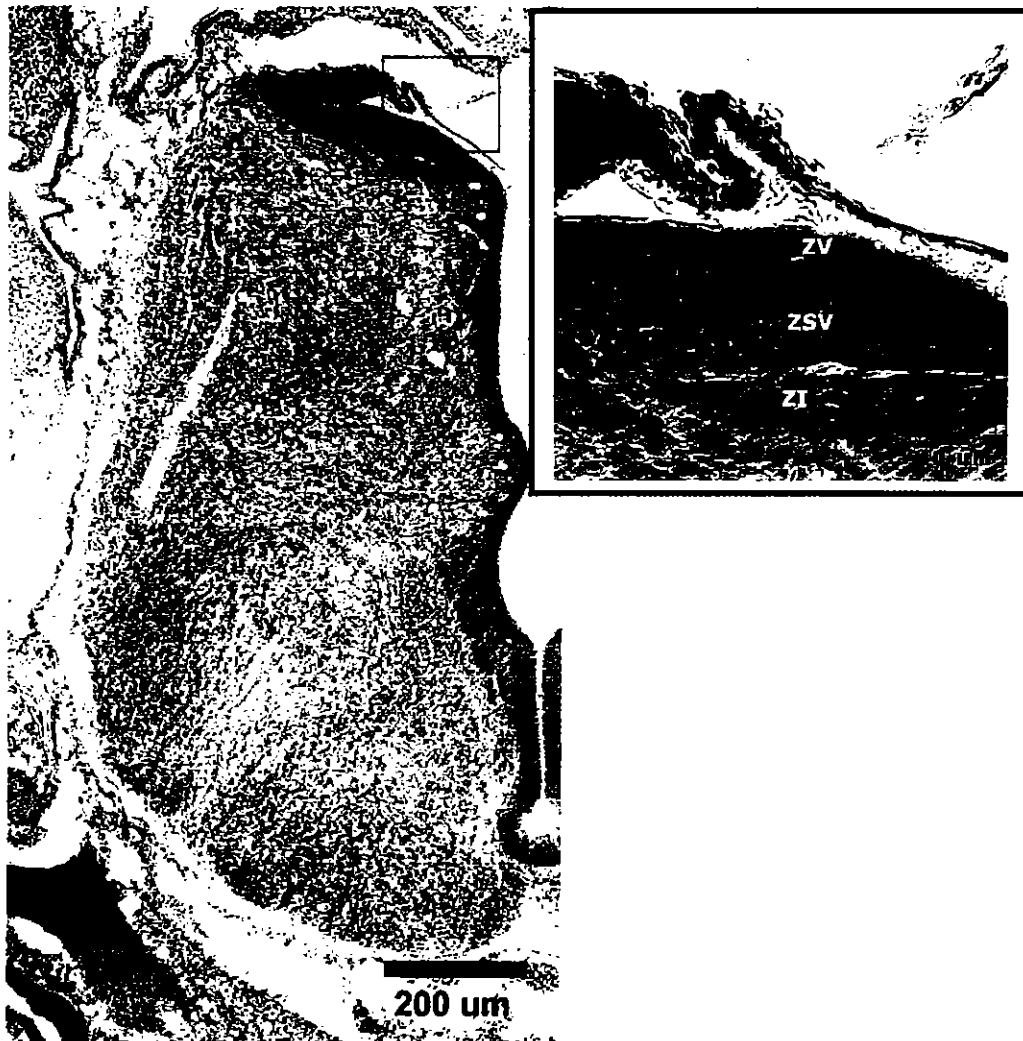
MATERI DAN METODE

Pengambilan spesimen dilakukan di Karantina Hewan, Pusat Studi Satwa Primata, LPPM-IPB, mulai Agustus 2002-Februari 2005. Pewarnaan imunohistokimia di laboratorium Biologi, laboratorium Patologi dan Lipid-Pusat Studi Satwa Primata (PSSP), LPPM IPB. Visualisasi hasil pewarnaan dilakukan di laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi Pusat Studi Satwa Primata, LPPM IPB, Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan-UGM, Yogyakarta, dan Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan-IPB, Bogor.

Penelitian menggunakan fetus MEP berumur 40 (F 40), 55 (F 55), 70 (F 70), 85 (F 85), 100 (F 100), 120 (F 120), dan 150 hari (F 150), serta anak umur 10 (P 10) dan 105 hari (P

105) masing-masing satu ekor yang merupakan sumbangan dari PSSP, LPPM-IPB. Fetus dikeluarkan melalui laparotomi medianus dengan prosedur standar untuk bedah sesar. Pelaksanaan penelitian dilakukan di bawah pengawasan dan persetujuan Komisi Kesejahteraan Hewan (*Institutional Animal Care and Use Committee/IACUC*) PSSP, LPPM-IPB nomor 02-0030IR.

Dalam keadaan terbius, hewan dikorbankan dan diperfusi dengan menggunakan paraformaldehid 0,2% dalam 0,1M *phosphate buffered* (PB), pH 7,4 suhu 37°C sebagai larutan *prerinse*, dilanjutkan dengan fiksatif paraformaldehid 2% dalam 0,01 M PB, pH 7,4 suhu 4°C. Jaringan otak diambil dan difiksasi dalam larutan paraformaldehid 2% dalam PB suhu 4°C selama 24 jam.



Gambar 1. Sayatan koronal bakal medula oblongata pada F 40 dengan pewarnaan imunohistokimia TH.

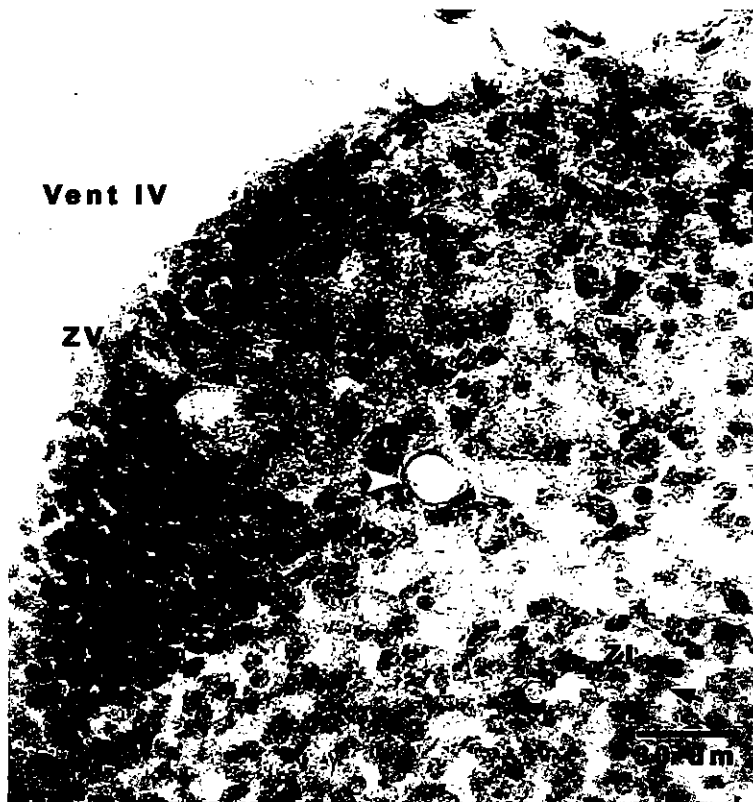
Di daerah bakal area postrema tidak terdapat sel neuroepitelial yang imunoreaktif terhadap TH. Aktivitas neurogenesis yang tinggi teramati pada zona ventrikularis, zona subventrikularis, dan zona intermedia (Gambar insert).

ZV = zona ventrikularis ZSV = zona subventrikularis ZI = zona intermedia

Otak dipotong menjadi dua bagian secara longitudinal di garis median. Bagian kiri disayat koronal dengan ketebalan 5 mm, tegak lurus terhadap garis bayangan yang ditarik dari bagian tengah komisura anterior menuju komisura posterior. Masing-masing sayatan diblok dalam paraffin, disayat secara serial dengan ketebalan 12 μm menggunakan *rotary microtome*, pada interval sayatan 460 (P 105), 403 (P 10), 444 (F 150), 387 (F 120), 274 (F 100), 242 (F 85), 169 (F 70), 137 (F 55), dan 55 μm (F 40). Sayatan pada tiap-tiap interval dibuat rangkap dua, masing-masing untuk pewarnaan TH dan *cresyl violet*. Untuk pewarnaan imunofloresen, setelah diperfusi spesimen otak difiksasi dalam larutan sukrosa

30%, kemudian disayat beku secara sagital dengan ketebalan 12 μm menggunakan *cryotome*, dengan interval pengambilan 120 μm .

Pewarnaan *cresyl violet* dilakukan menurut metode LaBossiere (1976), dengan modifikasi waktu inkubasi dalam *cresyl violet* menjadi 30 menit (protokol standar 5 menit). Hasil pengamatan pewarnaan *cresyl violet* dicocokkan dengan gambar potongan otak pada *Template Atlas of the Primate Brain* (Martin and Bowden, 1996) dan atlas otak pada monyet Rhesus (Oertel, 1969) untuk menyeleksi slide yang memiliki AP. Sayatan kedua pada slide yang memiliki AP diwarnai secara imunohistokimia menggunakan antibodi



Gambar 2. Sayatan koronal daerah bakal AP pada medula oblongata pada F 55 dengan pewarnaan imunohistokimia terhadap TH.

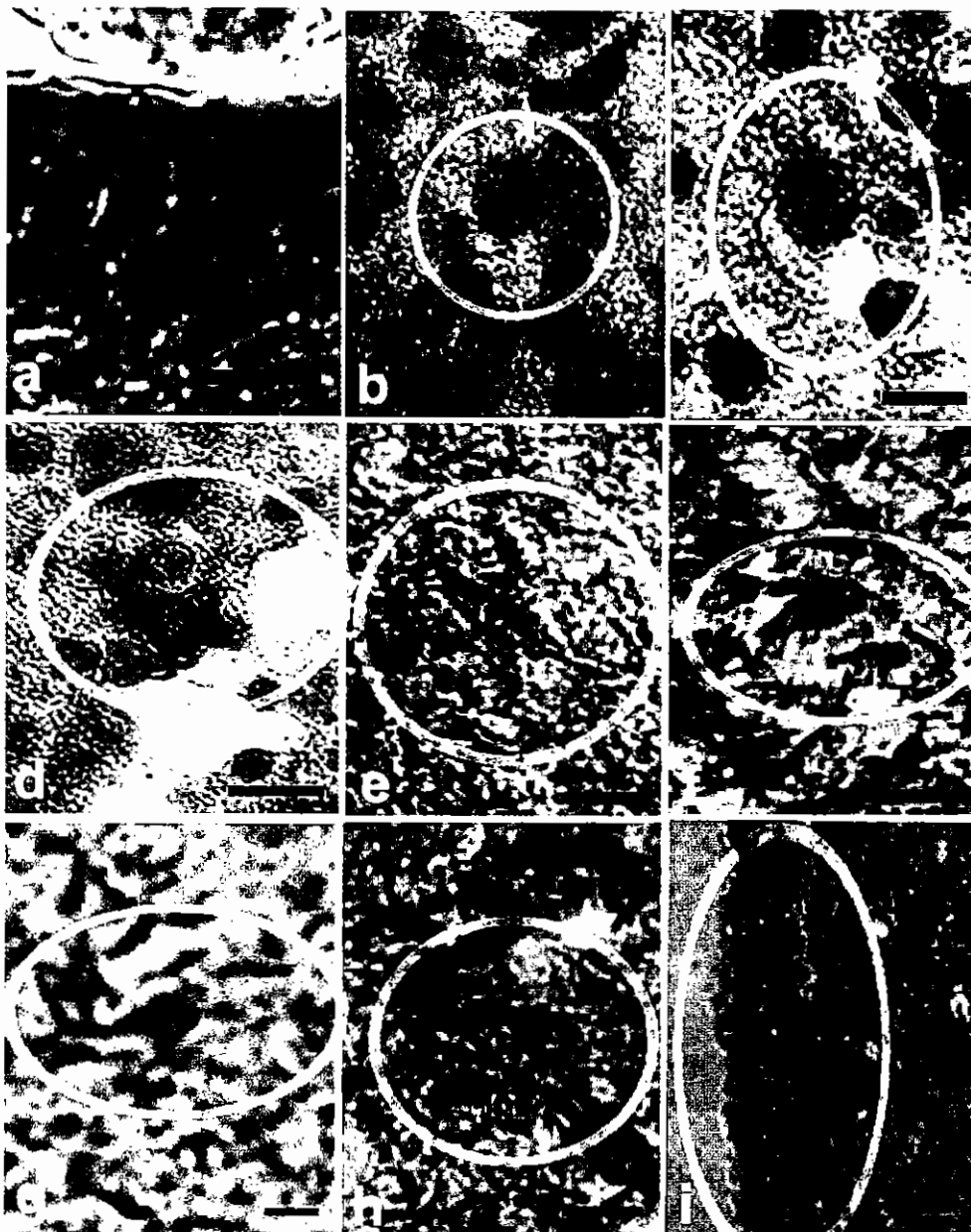
Bakal area postrema terletak berbatasan dengan ventrikel IV dan neuron katekolaminergik terdistribusi pada zona subventrikularis dan zona intermedia. Zona ventrikularis dipadati oleh sel yang sedang berproliferasi. Kepala panah putih menunjukkan pembuluh darah di area postrema. Neuron KA (warna coklat) dapat dilihat pada daerah SVZ dan IZ (anak panah hitam).

SVZ = zona subventrikularis. IZ = zona intermedia. VZ = zona ventrikularis

terhadap TH menurut metode Lorke *et al.* (2003) yang dimodifikasi dengan pemberian antibido primer *rat anti-TH mouse serum* (ImmunoStar, cat. no. 2291) dalam konsentrasi 1:2500 selama 4 hari pada suhu 4 °C dan antibodi sekunder yaitu *biotinylated anti-mouse IgG (H+L) horse serum* (Vector, cat. no. BA-

2000) yang diinkubasikan selama 1 jam pada suhu ruang.

Hasil pewarnaan diamati di bawah mikroskop dan divisualisasikan secara digital, kemudian ditransfer kedalam komputer menggunakan perangkat lunak *neurolucida*. Gambar yang dihasilkan diolah



Gambar 3. Perkembangan bentuk neuron katekolaminergik di AP pada F 40 sampai P 105

Neuron katekolaminergik di area postrema ir-TH negatif pada F 40, kemudian mulai teramati dengan bentuk bulat, inti besar dan sitoplasma sedikit pada F 55, dan menjadi bipolar dengan prosesus sitoplasma pendek pada F 100, serta menjadi bipolar dengan prosesus sitoplasma panjang pada P105. Bar 10 μ .

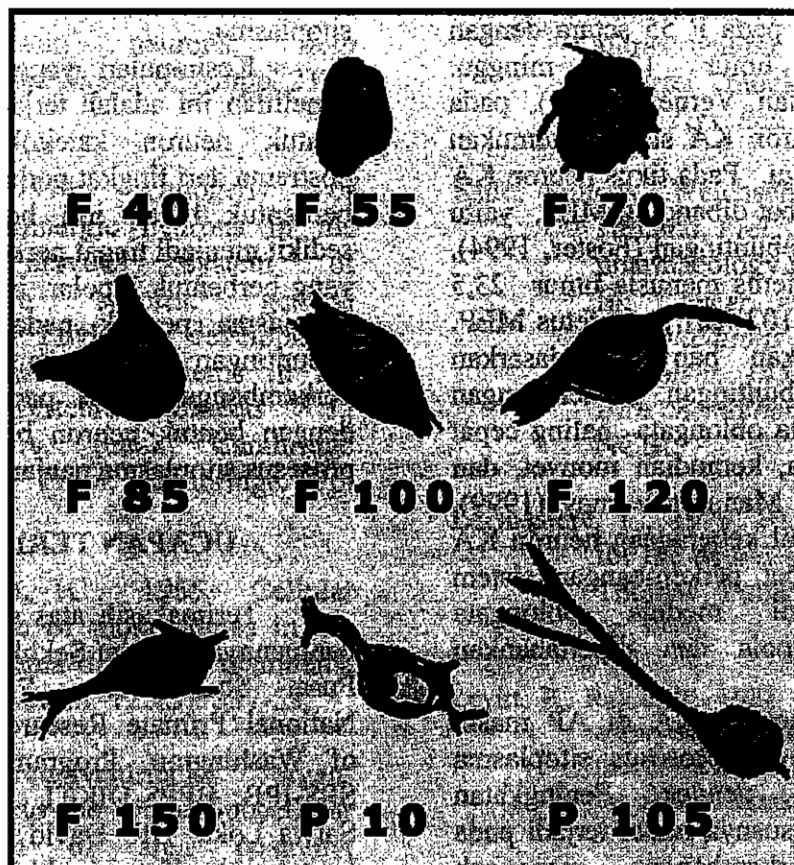
mempergunakan perangkat lunak *Adobe Photoshop CS edition*. Neuron yang TH-
imunoreaktif (TH-ir) dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada F 40 neuron KA di daerah kaudal medula oblongata belum ditemukan, tetapi dapat dilihat adanya aktivitas neurogenesis tinggi yang ditandai dengan tebalnya zona ventrikularis dan zona subventrikularis (Gambar 1). Kemungkinan pada fetus umur 40 hari ini neuron KA sudah terbentuk tetapi belum mengalami diferensiasi lebih lanjut, sehingga belum dapat mengekspresikan TH. Hal ini sesuai dengan laporan Levitt and Rakic (1982) yang menyatakan bahwa neuron monoaminergik pada batang otak bagian kaudal monyet Rhesus sudah terbentuk pada

embrio umur 35-43 hari dan mencapai puncaknya pada umur antara 38-40 hari. Secara umum, tahap-tahap perkembangan neuron adalah terbentuknya (lahirnya) neuron, diikuti dengan proliferasi, migrasi, diferensiasi, dan terakhir proses maturasi. Proses diferensiasi dapat terjadi secara tumpang tindih bersama dengan proses proliferasi dan migrasi (Shepherd, 1983; Insel, 2000; Morilak *et al.*, 2000).

Neuron KA mulai ditemukan pada F 55 di daerah bakal AP yang berbatasan dengan ventrikel IV, berbentuk agak bulat dan menonjol ke arah ventrikel yang terwarnai kuning kecoklatan dengan kromogen 3,3-*diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB). Pada zona ventrikularis dan zona subventrikularis tampak sel-sel yang berproliferasi, sehingga daerah ini tampak tebal dan dipenuhi sel-sel muda. Neuron KA dapat



Gambar 4. Sketsa perkembangan bentuk neuron KA di AP F 40 sampai P105. Pada F 40 neuron KA ir-TH negatif.

dilihat pada zona subventrikularis dan zona intermedia (Gambar 2). Neuron KA di daerah bakal AP pada F 55 ini berbentuk bulat dengan inti besar dan memiliki sedikit sitoplasma (Gambar 3), tersebar pada zona subependima dan zona intermedia.

Neuron dengan morfologi seperti ini merupakan neuron yang masih muda, aktif bermitosis sehingga intinya besar. Menurut La Velle dan La Velle 1970 dalam Lorke *et al.* (2003), sitodiferensiasi neuron terdiri dari tiga tahap perkembangan morfologi, yaitu perkembangan awal neuron bersifat apolar, berbentuk bulat dan tidak mempunyai prosesus, perkembangan tengah neuron berbentuk bipolar memiliki satu atau dua prosesus sitoplasma yang pendek, dan perkembangan akhir sebagian besar neuron berbentuk multipolar dengan beberapa prosesus sitoplasma dan ujung prosesus yang sudah mencapai tempat invasi.

Neuron KA di daerah medula oblongata yang mulai teramati pada F 55 setara dengan embrio manusia umur 12,5 minggu. Berdasarkan penelitian Verney (1999), pada embrio manusia neuron KA sudah ditemukan pada umur 4,5 minggu. Pada tikus neuron KA ditemukan lebih lambat dibanding MEP, yaitu pada umur 13 hari kebuntingan (Foster, 1994), yang setara dengan fetus manusia umur 23,5 minggu dan umur 102 hari pada fetus MEP. Hal ini menunjukkan bahwa berdasarkan lamanya periode kebuntingan, perkembangan neuron KA di medula oblongata paling cepat terjadi pada manusia, kemudian monyet, dan tikus paling lambat. Menurut Verney (1999), perbedaan waktu awal keberadaan neuron KA tersebut diduga akibat perkembangan sistem katekolaminergik di medula oblongata mamalia sudah terpola dan dipertahankan secara filogenetik.

Pada F 70 neuron KA di AP masih berbentuk bulat dengan prosesus sitoplasma yang sedikit dan pendek. Peningkatan sitoplasma dan prosesusnya mulai terjadi pada F 85. Stadium perkembangan menengah dimulai pada F 100, ditandai dengan neuron yang berbentuk bipolar serta prosesus sitoplasma lebih panjang. Sampai pada P 105,

neuron di AP didominasi oleh bentuk neuron bipolar dengan arah prosesus sitoplasma yang sejajar dengan permukaan AP, dan hanya sebagian kecil yang arahnya tegak lurus terhadap permukaan. Pada P 105 ini bentuk neuron bipolar tidak berubah, hanya jumlahnya saja yang bertambah sesuai dengan penambahan umur (Gambar 3). Perkembangan bentuk neuron KA di AP secara skematis ditampilkan pada Gambar 4.

Neuron KA di AP pada fetus umur 100 hari berada dalam stadium perkembangan menengah yang ditandai dengan adanya neuron bipolar yang memiliki prosesus sitoplasma pendek, tetapi melanjut ke stadium perkembangan bentuk akhir pada anak umur 105 hari dengan neuron berbentuk bipolar dengan prosesus sitoplasma yang panjang, sesuai dengan pendapat Fuxe and Owman (1965) dan menurut Klara and Brizzee (1975) pada monyet neuron di AP berbentuk bulat atau oval dengan satu atau dua penjurulan sitoplasma.

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah terjadinya perkembangan bentuk neuron katekolaminergik di area postrema dari tingkat perkembangan awal yaitu berbentuk bulat, inti besar dan sitoplasma sedikit menjadi tingkat perkembangan menengah yang berbentuk bipolar, inti oval dan prosesus sitoplasma pendek pada pertengahan masa kebuntingan dan menuju pada bentuk perkembangan akhir pada periode postnatal dengan bentuk neuron bipolar, inti oval dan prosesus sitoplasma panjang.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih atas segala dukungan dan bantuannya kepada: Sekolah Pascasarjana IPB, Pusat Studi Satwa Primata, LPPM-IPB, National Primate Research Center-University of Washington, Program Studi Primatologi SPS-IPB, BPPS-DIKTI, APERI, PT. Wanara Satwa Loka, DR. David Pow dari Queensland University, Komisi IACUC-IPB, Staff di Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB dan UGM.

DAFTAR PUSTAKA

- Arango, V., Ruggiero, D.A., Callaway, J.L., Anwar, M., Mann, J.J., Reis, D.J., 1988. Catecholaminergic neurons in the ventro medulla and nucleus of the solitary tract in the human. *J. Comp. Neurol.* 273, 224-40.
- Armstrong, D.M., Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., Miller, R.J., 1981. Immunocytochemical localization of catecholaminergic synthesizing enzymes and neuropeptides in area postrema and medial nucleus tractus solitarius of rat brain. *J. Comp. Neurol.* 196(3):505-17.
- Dahlström, A., Fuxe, K., 1964 . Evidence for the existence of monoamine – containing neuron in the central nervous system. I. Demonstration of monoamine in the cell bodies of the brain stem neurons. *Acta Neuropathol. Suppl.* 62 (Suppl 232): 1-55.
- Foster, G.A., 1994. Ontogeny of catecholaminergic neurons in the central nervous system of mammalian species: general aspects, In: Phylogeny development of catecholamine systems in the CNS of vertebrate. Smeets W.J., Reiner, A. (eds). Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 405-434.
- Fuxe, K., Owman, C., 1965. Cellular localization of monoamines in the area postrema of certain mammals. *J. Comp. Neurol.* 125(3): 337-53.
- Hay, M. 2001. Circumventricular organ: Gateways to the brain. Subcellular mechanism of area postrema activation. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 28, 551-557.
- Insel, T.R., 2000. The development of brain and behavior. <http://www.acnp.org/g4/GN401000066/Dafault.htm>.
- Kalia, M., Woodward, D.J., Smith, W.K., Fuxe, K., 1985. Rat medulla oblongata. IV. Topographical distribution of catecholaminergic neurons with quantitative three-dimensional computer reconstruction. *J. Comp. Neurol.* 233:350-64.
- Kitahama, K., Nagatsu, I., Pearson, J., 1994. Catecholamines system in mammalian midbrain and hindbrain: theme and variations. In: Phylogeny development of catecholamine systems in the CNS of vertebrate. Smeets W.J., Reiner, A. (eds). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 183-206.
- Klara, P.M., Brizzee, K.R., 1975. The ultrastructural morphology of the squirrel monkey area postrema. *Cell. Tiss. Res.* 160: 315- 26.
- Kufe, Pollock, Weichselbaun, Bast, Gansier, Holland, Frei. 2003. Physiology and pharmacology in controlling emesis. In: *Cancer medicine. Part VIII. Complications of cancer and its treatment. 145. Antiemetic therapy with chemotherapy.* BC Deaker Inc. NCBI.
- LaBossiere, E., 1976. Histological processing for the neural sciences. Charles and Thomas Publisher. Illinois. USA. pp:39-40.
- Levitt, P., Rakic, P., 1982. The time of genesis, embryonic origin and differentiation of the brain stem monoamine neuron in the rhesus monkey. *Brain Res.* 256(1): 35-57.
- Lorke, D.E., Kwong, W.H., Chan, W.Y., Yew, D.T., 2003. Development of catecholaminergic neurons in the

- human medulla oblongata. *Life Science* 73, 1315-31.
- Maghood, A., Batten, T.F., Berry, P.A., McWilliam, P.N. 1993. Distribution of dopamine-containing neurons and fibers in feline medulla oblongata: a comparative study using catecholamine-synthesizing enzyme and dopamine immunohistochemistry. *Neuroscience*. 53(3): 717-33.
- Martin, R.F., Bowden, D.M., 1996. *Template atlas of the primate brain*. Neuroscience Division- Regional Primate Research Center and Primate Information Center - Health Sciences Libraries & Information Center, University of Washington, Seattle, USA.
- Miceli, M.O., Post, C.A., van der Kooy, D., 1987. Catecholamine and serotonin colocalization in projection neurons of the area postrema. *Brain Res*. 412(2); 381-5.
- Miller, A.D., Leslie, R.A., 1994. The area postrema and vomiting. *Frontiers in Neuroendocrinology* 15 (4): 301-320.
- Morilak, D.A., Porteus, M.H., Ciaranello, R.D., 2000. Molecular and cellular mechanisms of brain development. Nancy Pritzker Laboratory of Developmental and Molecular Neurobiology, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Stanford University School of Medicine, Stanford. <http://www.acnp.org/g4/GN401000065/Default.htm>.
- Oertel, G., 1969. Zur Zytologie und Myeloarchitektur des Rhombencephalon des Rhesusaffen (*Macaca mulatta* Zimmermann). *J. für Hirnforschung. Internat. J. für Neurobiol.* 11(5):28-54.
- Reiner, A. 1994. The study of catecholaminergic perikarya and fibers in the nervous system: methodological considerations and technical limitations. In: *Phylogeny development of catecholamine systems in the CNS of vertebrate*. Smeets W.J., Reiner, A. (eds). Cambridge University Press, Cambridge. pp.1-6.
- Schreihöfer, D.A., Cameron, J.L., Verbalis, J.G., Rinaman, L., 1997. Cholecystokinin induces fos expression in catecholaminergic neurons of the macaque monkey caudal medulla. *Brain Res*. 770: 37-44.
- Sherperd MG. 1983. Development. In: *Neurobiology*. Oxford Univ Press, Oxford. Pp. 165-183.
- Verney, C., 1999. Distribution of catecholaminergic neurons in the central nervous system of human embryo and fetuses. *Microsc. Res. and Tech.* 46: 24-47.
- Yamamoto, H., Kishi, T., Lee, C., Choi, B.J., Fang, H., Hollenberg, A.N., Drucker, D.J., Elmquist, J.K., 2003. Glucagon-like peptide-1-responsive catecholamine neurons in the area postrema link peripheral glucagon-like peptide-1 with central autonomic control sites. *J. Neurosci.* 23(7): 29-39.