

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE
MEXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

**“SEGREGACION DE TRANSMISORES
Y CO-TRANSMISORES EN LAS NEURONAS
PREGANGLIONARES SIMPATICAS”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

CYNTHIA GABRIELA SAMANO SALAZAR

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. MIGUEL ANGEL MORALES MENDOZA

MEXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó dentro del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, con sede en el Departamento de Biología celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; bajo la tutoría del Dr. Miguel Angel Morales Mendoza y con la co-tutoría del Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar y del Dr. Gonzálo Martínez de la Escalera

Cynthia Gabriela Sámano Salazar fue becaria durante sus estudios doctorales por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el registro 189227

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Miguel A. Morales Mendoza por la excelente asesoría, apoyo y confianza que siempre me brindó para desarrollar mi tesis doctoral.

A los Dres. Rafael Gutiérrez Aguilar y Gonzálo Martínez de la Escalera, miembros del comité tutorial, por su continua asesoría y acertados comentarios que me permitieron avanzar y finalizar este proyecto.

Al Dr. Fredy Cifuentes Navarro por su valiosa asesoría, colaboración, consejos y amistad que me brindó durante mi estancia en el laboratorio.

A los miembros del jurado, Dres. Julio Morán, Stefan Mihailescu, Pablo Pacheco y Francisco Pellicer, por su participación, comentarios y sugerencias finales.

A la QFB Ma. Elena Zetina Rosales, técnica académica del laboratorio, por el excelente y valioso soporte técnico, ayuda, consejos y amistad que me dio durante mis estudios.

Al Técnico Pedro Medina por la excelente ayuda, apoyo y manejo con los animales de experimentación.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio: Hugo, Jazmín, Rafael, Anabell, Alejandro, Blanca y Carla; por su ayuda, recomendaciones y comentarios.

Al CONACYT, por el financiamiento brindado a través de una beca para realizar los estudios de doctorado.

Finalmente, a la UNAM por las excelentes oportunidades que ofrece, tanto curriculares como extra-curriculares, y las cuales contribuyeron desde el bachillerato a mi formación académica y personal, gracias.

DEDICATORIAS

A mis abuelitos (Luz María y Abraham), por haberme dado y enseñado siempre lo mejor y quienes simplemente se me adelantaron en el camino.

A mis padres Gabriela y Víctor, a mi tía Isabel y a Juanita, por el infinito apoyo, confianza, ayuda, cariño, comprensión y enseñanzas a que me han dado siempre; mil gracias.

A mis hermanos Victorín, Dieguito y Lupita, a quienes adoro y alegran tanto mi vida.

A mis tíos Abraham, Jaime, Beto, Lupita, Lulú; a mis primos Kathya, Nadia, Omar, Leslie, Jaime y Marthita; a mi abuelito Beto; y a mis sobrinos.

A todos mis grandes y mejores amigos por su apoyo incondicional: Paty, Sandy, Mónica, Anabell, Rafael, Mario, Gabriela, Rodrigo, Eli, Tona, Bere, Karla, Daniel, Edgar, Aldo, Claudia, Jazmín, Hugo, Julio César Juan Diego, Samuel, Juan, y demás.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
• Neurotransmisión	5
• Co-transmisión y neuromodulación	8
• Patrón morfológico de almacenamiento de transmisores y co-transmisores	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
HIPOTESIS	18
OBJETIVOS	19
• Objetivos particulares	19
METODOLOGIA	21
• Procedimientos quirúrgicos	21
• Inmunohistoquímica	23
• Captura digital de las imágenes	25
• Muestreo, análisis de imágenes, cuantificación de la co-existencia y su estadística	27
RESULTADOS	31
1. Presencia de neuronas preganglionares simpáticas (NPS) colinérgicas en las astas intermediolaterales de la médula espinal de gato y rata	31
2. Prácticamente todos los cuerpos celulares de las neuronas peptidérgicas fueron positivas a ChAT o VACHT	32
3. Presencia de ChAT y VACHT en los ganglios simpáticos, estelar del gato y cervical superior de la rata	36

4.	En los ganglios simpáticos, más de la mitad de las fibras y botones axónicos preganglionares son peptidérgicos y no colinérgicos	38
5.	Localización independiente de ChAT y péptidos en el tronco torácico simpático de gato	41
6.	Análisis por microscopia confocal de una fibra peptidérgica no colinérgica	45
7.	La mayoría de los botones peptidérgicos no expresan proteínas de vesículas sinápticas	47
8.	Distribución regional de las co-existencias de ChAT, VACHT, mENK y Syn y dentro del ganglio simpático	51
	DISCUSION	53
	CONCLUSIONES	60
	BIBLIOGRAFIA	62
	APENDICE I	72
•	Generalidades del Sistema Nervioso Autónomo (SNA)	72
•	División simpática	73
•	Ganglios simpáticos	75
1)	Ganglios cervicales	75
–	Ganglios cervicales superiores	76
–	Ganglios cervicales medios	76
–	Ganglios cervicales inferiores	76
2)	Ganglios torácicos y lumbares superiores	76
3)	Ganglios lumbares bajos y sacrales	76
•	División parasimpática	77
•	División entérica	78

APENDICE II	79
1. Artículo publicado, Sámano et al, 2006 (Synapse, 60:295–306)	79
2. Artículo publicado, Sámano et al, 2009 (Neuroscience (2009) , doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.06.010	86

• **ABREVIATURAS**

5-HT- 5-hidroxytriptamina o serotonina
ACh- acetilcolina
ADP- nucleótido adenosin 5' -difosfato
AMP- nucleótido adenosin 5' - monofosfato
ATP- nucleótido adenosin 5'-trifosfato
BC- buccalina
BSA- suero de albúmina bovina
CA- área central autonómica
cc- canal central
CGRP- péptido del gen relacionado con la calcitonina
ChAT- colina acetiltransferasa
CO- monóxido de carbono
Cy5- Cinanine 5
DH- asta dorsal
DS- suero de burro
FITC- isotiocianato de fluoresceína
GABA- ácido γ amino butírico
GCS- ganglio cervical superior
GE- ganglio estelar
GTP- guanina trifosfato
IC- núcleo intercalado
IMLf- núcleo intermediolateral pars funicularis
IMLp- núcleo intermediolateral pars principales
IR- inmunorreactividad
LDCV- vesículas grandes de núcleo denso
LF- funículo lateral
mENK- metionina encefalina
NA- noradrenalina
NO- óxido nítrico
NPS- neuronas preganglionares simpáticas
NPY- neuropéptido Y o tirosina
NT- neurotensina
PBS- buffer de fosfatos
SCP- péptido pequeño cardioactivo
scv- vesículas pequeñas claras
SN- sistema nervioso
SNA- sistema nervioso autónomo
SNC- sistema nervioso central
SOM- somatostatina
Syn- synaptofosina
Syt- synaptotagmina
TTS- tronco torácico simpático
TxR- texas red
UTP- uracilo trifosfato
UV- ultravioleta
VAcHT- transportador vesicular de acetilcolina
VH- asta ventral
VIP- péptido intestinal vasoactivo
WR- ramo comunicante blanco del tronco torácico simpático
Zn- zinc

RESUMEN

Las neuronas preganglionares simpáticas (NPS) forman parte de la vía eferente motora autonómica y usan como transmisor principal a la acetilcolina (ACh) y a diversos péptidos como co-transmisores. Como en otras neuronas, se acepta de manera general que los transmisores clásicos y los co-transmisores son co-almacenados y co-liberados de las terminales presinápticas. No obstante, existen trabajos que muestran que aunque los cuerpos celulares de las NPS co-expresan a la enzima ChAT (colina acetiltransferasa, enzima que sintetiza la ACh y se usa como su marcador) y al péptido co-transmisor metionina-encefalina (mENK); a nivel de sus proyecciones axonales (fibras, botones y terminales, distribuidos en los ganglios simpáticos) estas moléculas pueden expresarse preferencialmente en distintos procesos axonales, dando lugar a la presencia de procesos axonales preganglionares peptidérgicos negativos a ChAT. La discrepancia en el grado de co-existencia de transmisores entre los cuerpos celulares y los botones y terminales axónicas, pudiera deberse a que existan subpoblaciones de NPS tanto colinérgicas como no colinérgicas y que ambas expresen péptidos; o bien que todas las NPS sinteticen tanto ChAT como péptidos y que los segreguen a diferentes procesos celulares. Con el propósito de discernir entre estas dos posibilidades, investigamos la presencia, así como el nivel de co-existencia o segregación de los péptidos neurotensina (NT), metionina-encefalina (mENK), péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), somatostatina (SOM) y el péptido vasoactivo intestinal (VIP) con ChAT tanto a nivel de los somas, axones y varicosidades de las NPS de gato, así como también la presencia y nivel de co-existencia o segregación del péptido mENK con dos marcadores colinérgicos, ChAT y VAcHT (transportador vesicular de la ACh), en los somas, botones y terminales de las NPS de rata.

Encontramos tanto en gato como en rata que en los somas de las NPS la co-existencia de los péptidos con ChAT o VAcHT es prácticamente del 100%, mientras que en sus botones y terminales axónicas la co-existencia es alrededor del 40%; lo que apoyan la posibilidad de que en estas neuronas simpáticas ocurra una segregación de mediadores al nivel de los botones y terminales axónicas. En los axones que corren a lo largo del tronco torácico simpático sólo encontramos co-existencia de los marcadores cuando interrumpimos el transporte axonal, sugiriendo que los transmisores se transportan de manera secuencial en los axones. Estos resultados descartan la posibilidad de que las fibras sólo peptidérgicas provienen de una segunda población de NPS no colinérgicas, ya que todos los somas peptidérgicos fueron colinérgicos.

Considerando el almacenaje vesicular, aceptado para la ACh en vesículas claras (scv) y mENK en grandes de núcleo denso (LDCV), la presencia de varicosidades encefalinérgicas no colinérgicas nos llevó a explorar el patrón vesicular de estos atípicos botones. Para ello estudiamos la posible co-existencia del péptido mENK con las proteínas vesiculares, synaptofisina (Syn) para scv y synaptotagmina (Syt) para LDCV. Encontramos que alrededor del 60% de la población de los botones y terminales encefalinérgicas no expresan ni Syn ni Syt; además de la población total de varicosidades encefalinérgicas, las no colinérgicas son las que mayoritariamente no expresan Syn.

Nuestros datos sugieren fuertemente que las NPS pueden segregar péptidos de los marcadores colinérgicos a nivel de sus procesos axonales. El hecho de que las

terminales encefalinérgicas no colinérgicas no contengan IR a la Syt, pudiera ser porque la mENK esté almacenada en vesículas sinápticas atípicas diferentes a las scv y LDCV.

Sugerimos que este mecanismo de segregación o distribución diferencial, pudiera ser transitorio y depender de cambios funcionales o demandas de las sinapsis, de tal forma que cada botón presináptico almacenaría y liberaría al ó los mediadores que se requirieran de acuerdo al entorno sináptico.

Consecuentemente la co-transmisión pudiera llevarse a cabo por la liberación conjunta de transmisores pero provenientes de diferentes botones y terminales axónicas y no necesariamente por la liberación de transmisores co-almacenados de las mismas terminales axónicas.

ABSTRACT

Sympathetic preganglionic neurons (SPN) belong to the autonomic motor efferent pathway, they use the classical transmitter acetylcholine (ACh) as diverse co-transmitters (like neuropeptides). Like other neurons, it is generally accepted that classical transmitters and co-transmitters are co-stored and co-released from the same presynaptic endings; however there are studies which have shown although Choline acetyl-transferase (ChAT, synthesizing enzyme of ACh which it uses as marker) and methionin-enkephalin (m-ENK) are co-expressed in SPN cell bodies, these molecules are expressed in different axonal processes (fibers and boutons), bearing preganglionic axonal processes peptidergic negatives to ChAT. This discrepancy between the level of transmitters co-existence in cell bodies and axonal fibers and boutons, could be due to: 1) existence of SPN subpopulations cholinergic and non-cholinergic and both of them expressing neuropeptides; and 2) all SPN could synthesize ChAT and neuropeptides and route them to different fibers and boutons. To discern between these possibilities, we explored the level of possible expression and co-expression or segregation of the peptides, neurotensin (NT), methionin-enkephalin (mENK), somatostatin (SOM), calcitonin gene-related peptide (CGRP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) and ChAT in cell bodies, axons and varicosities of cat SPN. We also explored the existence and level of co-existence or segregation of methionin-enkephalin (mENK) with the cholinergic markers, ChAT and VACHT (vesicular acetylcholine transporter) in cell bodies and varicosities of rat SPN.

We found, both in cat and rat, an almost complete co-localization in SPN cell bodies, of the explored peptides with ChAT and VACHT. On the contrary we observed independent localization of immunoreactivity for the peptides and ChAT or VACHT in axonal fibers and boutons, suggesting the possibility of neurotransmitters segregation at the level of ending boutons. At the level of sympathetic trunk we could observed co-localization between ChAT and peptides in preganglionic axon fibers, only after axonal interruption indicating a sequential axonal transport of ChAT and peptides. These data discard the presence of a second population of SPN only peptidergic, supporting the possibility of segregation of ACh and peptides.

Considering the vesicular storage for ACh in small clear vesicles (scv) and mENK in large dense core vesicles (LDCV), the presence of m-enkephalinergic non-cholinergic varicosities, lead to us to characterize the vesicular features of these atypical boutons. We explore the possible co-existence between mENK with the vesicular proteins synaptophysin (Syn) for scv and synaptotagmin (Syt) for LDCV. We found that 60% of enkephalinergic boutons did not express either Syn or Syt; moreover all of the population m-enkephalinergic varicosities, the non-cholinergic subset mostly did not express Syn.

Our data strongly suggest that SPN segregate peptides from ChAT and VACHT. It is possible that the enkephalinergic non-cholinergic boutons did not express Syn because the mENK could be stored in atypical synaptic vesicles, different to scv and LDCV.

We suggest that cellular segregation or differential distribution could be transient and could be according to the functional changes of the synapses. Thus each presynaptic bouton would store and release the transmitter or co-transmitters depending on synaptic environment.

Consequently, co-transmission in sympathetic ganglia could be based on the concurrent release of transmitters and co-transmitters from distinct presynaptic boutons, rather than in the co-release of these mediators from the same axon process.

INTRODUCCION

- **Neurotransmisión**

En el sistema nervioso, las neuronas se encargan de propagar los impulsos nerviosos que se generan de la periferia hacia el cerebro y de ahí a los órganos periféricos. La transmisión de la información nerviosa se propaga a lo largo de las neuronas, usualmente de los axones a las dendritas o somas, así como entre las neuronas a través de las sinapsis. Las sinapsis pueden ser de tipo eléctrico o químico de acuerdo a como se transmite el impulso nervioso. En este trabajo nos enfocamos al estudio morfológico de las sinapsis químicas de los ganglios autonómicos.

A finales del siglo XIX, una vez que se introdujeron los conceptos de la teoría neuronal por Santiago Ramón y Cajal y el de sinapsis por Charles Sherrington, se consideró por varios años que en el sistema nervioso predominaban las sinapsis eléctricas, en donde la corriente pasa directamente de una célula a otra, sin embargo, los estudios clásicos de JN Langley y de TR Elliot en las uniones neuromusculares autonómicas y en los ganglios autonómicos apuntaban a que la transmisión sináptica era de tipo químico (Valenstein 2002) y aunque existía la idea de que algún tipo de molécula o sustancia química participaba en la comunicación neuronal aún no se conocían cuáles eran y cómo se liberaban, por lo que se inició la búsqueda de los agentes químicos capaces de funcionar como neurotransmisores.

Algunos años más tarde los trabajos de Elliot y Dale identificaron a la noradrenalina (NA) cuya función era vasoconstrictora, mientras que Loewi descubrió que la acetilcolina

(ACh) mediaba las respuestas de las sinapsis autonómicas entre el nervio vago y el corazón. Así que todo indicaba que tanto la NA como la ACh eran los neurotransmisores liberados en las sinapsis periféricas neuromusculares y en los ganglios autonómicos (Eccles, 1986; Valenstein, 2002; Tansey, 2006; Burnstock, 2009).

A partir de los hallazgos anteriores, HH Dale propuso el concepto de la neurotransmisión química (Dixon Memorial lecture to the Royal Society of Medicine, 1935), en el cual consideraba a todo tipo de neuronas como unidades metabólicas desde el soma hasta todos sus procesos celulares y en las cuales sus sinapsis operaban con el mismo mecanismo de transmisión química (citado en: Whittaker, 1984). Esta hipótesis fue promovida y nombrada por JC Eccles en 1955 como Principio de Dale en la cual se afirmaba que “el mismo transmisor químico se liberaba de todas las terminales sinápticas de una neurona”, y aunque en esta frase la intención era enfatizar que las neuronas funcionan como unidades químicas, por mucho tiempo se interpretó que una neurona sintetiza un solo neurotransmisor (citado en: Whittaker, 1984; Eccles, 1986; Strata and Harvey 1999); fue hasta varios años después que el mismo JC Eccles en un artículo que escribió y publicó en los 80’s aclaró la confusión respecto al famoso principio o postulado de Dale.

Casi de manera paralela a finales de los 50’s, Palay & Palade y De Robertis & Bennett presentaron las evidencias morfológicas de la transmisión química ya que observaron la ultraestructura de las terminales nerviosas e identificaron unas estructuras con membrana limitante en la presinapsis, a las cuales llamaron vesículas sinápticas y las propusieron como los sitios de almacenamiento de co-liberación de los mediadores

químicos. Dichos hallazgos terminaron por confirmar la teoría neuronal. Ahora se sabe que en las sinapsis químicas a diferencia de las eléctricas, los impulsos nerviosos se transmiten de una célula presináptica a una postsináptica a través de un mediador, se caracterizan por un retardo sináptico y es unidireccional (para revisión ver: Bear et al, 1996; Wilson et al, 1997; Guyton et al, 1998).

En general se aceptó que las neuronas pueden utilizar un neurotransmisor, ya sea excitador o inhibidor pero no ambos. Dicho concepto prevaleció hasta la década de los 60's, cuando por medio de técnicas bioquímicas, electrofisiológicas, de microscopia de luz y electrónica, se lograron aislar e identificar diversas moléculas (como aminoácidos), que junto con los neurotransmisores ya identificados participaban también en la transmisión sináptica en el sistema nervioso autónomo (SNA) (Apéndice) y del sistema nervioso central (SNC); la siguiente tabla muestra la clasificación de los neurotransmisores de acuerdo a su naturaleza química (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los neurotransmisores de acuerdo a su naturaleza química

Amina cuaternaria: Acetilcolina (ACh)

Aminas biogénicas: Dopamina (DA), Noradrenalina o Norepinefrina (NA o NE) y Adrenalina o Epinefrina (AD o E)

Indolamina: Serotonina (Ser ó 5-Hidroxytriptamina [5-HT]), Histamina (H)

Aminoácidos: ácido amino γ -butírico (GABA), Glutamato (Glu), Glicina (gly) y Aspartato (Asp)

Ahora, se sabe y acepta que la noradrenalina (NA) y la acetilcolina (ACh) son neurotransmisores que en el SNA ejercen funciones antagónicas. El SNA consiste de sinapsis colinérgicas ganglionares con efectores neuroviscerales noradrenérgicos (simpáticos) y colinérgicos (parasimpáticos).

El aislamiento de las sustancias químicas como potenciales neurotransmisores, llevó a establecer como convencional ciertos criterios para definir si una sustancia química podía considerarse como transmisor (Matthews, 1996; Oda, 1999; Prado et al, 2002) (Tabla 2).

Tabla 2. Características que identifican a los neurotransmisores.

-
- Moléculas de bajo peso molecular, aprox. 200 kDa.
 - Síntesis en las terminales sinápticas de las neuronas por una vía enzimática específica.
 - Las enzimas necesarias para la síntesis de los neurotransmisores se dirigen a las terminales axónicas por transporte axonal lento y algunas ocasiones rápido.
 - Almacenamiento en vesículas pequeñas claras (scv) y liberación de las terminales presinápticas,
 - Se liberan en las zonas activas de las terminales presinápticas.
 - Su liberación ocurre con cualquier frecuencia de estimulación.
 - Una vez liberados se acoplan a sus receptores (ionotrópicos o metabotrópicos) específicos localizados en las neuronas postsinápticas.
 - Producen una respuesta rápida y breve que genera cambios en el potencial de membrana de la neurona postsináptica.
 - Son eliminados del espacio sináptico mediante enzimas especializadas, o algún sistema de recaptura específico localizado en las terminales presinápticas.
-

• **Co-transmisión y neuromodulación**

Durante varias décadas se consideró que cada sinapsis utilizaba un solo mediador químico para propagar los impulsos nerviosos, sin embargo, hacia finales de la década de los 70's, surgieron trabajos en los cuales se reportaban en las terminales axónicas la presencia de otras sustancias biológicamente activas, capaces de inducir respuestas diferentes a las de los neurotransmisores reportados hasta ese momento (para revisión ver: Strand, 1999). Al respecto, en algunas neuronas del SNA se encontró que no solo almacenaban al neurotransmisor principal NA sino que también podían *co-almacenar* y *co-liberar* al nucleótido adenosin 5'-trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés) y al neuropéptido tirosina

(NPY), este último no produce una acción directa sobre las células post-sinápticas, pero si modifica o modula la liberación y respuesta de la NA y ATP a nivel pre y post-sináptico, en diferentes preparaciones del SNA de diversas especies (Sneddon & Burnstock 1985; Burnstock, 2006 (a); 2006 (b)).

Cada vez surgieron más datos de co-existencia en el sistema nervioso; G. Burnstock usó el concepto de *co-transmisión*, con el cual propuso que además de los transmisores principales co-existían otros mediadores a los que se les denominó como co-transmisores, que si bien no producían una respuesta sináptica si mostraban la capacidad de cambiar o modificar las acciones intrínsecas del *neurotransmisor principal* y por tanto la actividad de las neuronas post-sinápticas (Merighi, 2002; Burnstock, 1976, 2006 (b)). Al igual que los transmisores clásicos, los co-transmisores tienen características propias que los distinguen, tales como su biosíntesis, almacenamiento y degradación (Tabla 3).

Tabla 3. Características de los co-transmisores.

-
- Frecuentemente son moléculas de alto peso molecular, hasta 3000 kDa.
 - Son sintetizados en los cuerpos celulares de las neuronas, almacenados en vesículas de núcleo electrodensito (LDCV) y transportados a través de los axones por transporte axónico rápido hacia las terminales nerviosas.
 - Se liberan en las zonas extra-sinápticas de la membrana presináptica.
 - Su liberación ocurre cuando la frecuencia de estimulación es alta y repetitiva.
 - Una vez liberados se acoplan a sus receptores específicos de tipo metabotrópico, localizados en las neuronas postsinápticas.
 - Modulan la respuesta que produce el transmisor principal, ya sea inhibiendo o facilitando la transmisión sináptica.
 - Se eliminan del espacio sináptico mediante proteasas o su internalización en las terminales presinápticas; aún no se ha descrito algún sistema de recaptura o reciclaje en las terminales presinápticas.
-

En la actualidad se han reportado diversas moléculas que pueden modular la transmisión de la información nerviosa tanto en neuronas de vertebrados como de invertebrados, tales como los nucleótidos: adenosin 5'-monofosfato y difosfato (AMP y ADP), el uracilo trifosfato (UTP), la guanina trifosfato (GTP), mensajeros gaseosos, NO y CO (óxido nítrico y monóxido de carbono), factores tróficos, Zn (zinc, uno de los elementos más abundantes en el organismo), D-serina, y diversos péptidos comúnmente llamados neuropéptidos de alto peso molecular (hasta 3000 kDa) (Lundberg JM 1996; Zupanc, 1996; Barañano, et al, 2001; Salio et al, 2006; Hook et al, 2008). Y aunque desde los años 30's se habían descrito la presencia de algunos péptidos en el hipotálamo y otras regiones del cerebro, solo se había considerado su papel hormonal y no se sabía si tenían alguna otra función fisiológica en el sistema nervioso o si interactuaban junto con algún otro transmisor, bajo ciertas condiciones fisiológicas para controlar respuestas específicas en las neuronas (Burnstock, 1972; Sneddon & Burnstock 1985; Merighi, 2002; Salio et al, 2006; Burnstock 2006 (a), 2009).

En invertebrados se ha encontrado que algunas neuronas también co-transmiten. Uno de los primeros datos se mostraron en la década de 1970's, donde se encontró al ATP como un constituyente de las vesículas sinápticas colinérgicas en el órgano eléctrico de la raya eléctrica *Torpedo californica*; otro dato más se encuentra en el caracol *Helix aspersa*, donde las neuronas liberan 5-HT como transmisor principal y ACh como co-transmisor (Hanley and Cottrell, 1974); y un caso muy estudiado ha sido en las motoneuronas del músculo de la rádula accesoria del molusco *Aplysia californica*, en donde se ha demostrado co-liberación del transmisor principal ACh (con frecuencias bajas de estimulación) y de dos péptidos co-transmisores, el péptido pequeño cardioactivo y la buccalina (SCP y BC, por sus siglas en inglés) (con frecuencias altas de estimulación) (Vilim et al, 1996(a); 1996(b)).

Las evidencias fisiológicas y morfológicas indicaban que en las neuronas co-existían múltiples transmisores (al menos, un transmisor clásico con uno o varios péptidos co-transmisores) mismos que se co-liberaban ante un estímulo eléctrico adecuado; así fueron surgiendo más casos de co-existencia en las neuronas y no eran casos aislados o diferentes si no más bien parecía ser una característica general que presentaban las neuronas (Burnstock, 1976; Hökfelt et al, 1977; Lundberg and Hökfelt 1983; Bachoo et al, 1987; Kupfermann, 1991; Hökfelt et al, 1986; 1987; Elfvin et al, 1993; Merighi, 2002). Se consideró y aceptó entonces que las neuronas podían sintetizar y usar más de un transmisor para propagar los impulsos eléctricos en las neuronas, confirmando los conceptos de co-existencia y co-transmisión (Hökfelt et al, 1987; ver: Merighi, 2002; Burnstock, 2004) (Figura 1).

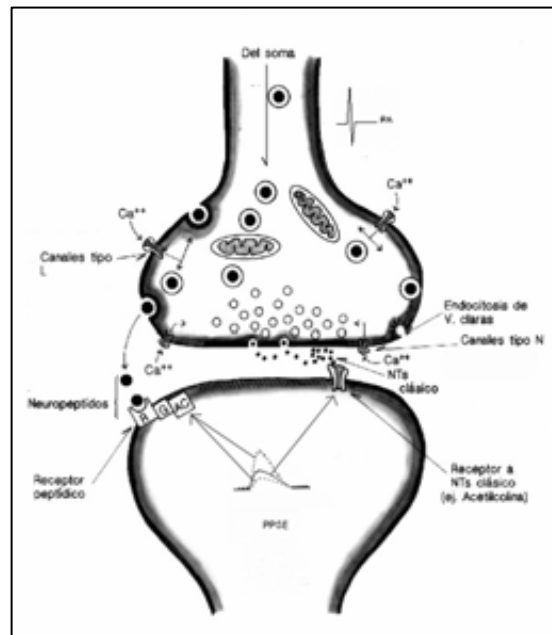


Figura 1. Esquema que presenta las características de la transmisión y co-transmisión de una sinapsis colinérgica (nicotínica). Se esquematiza una terminal presináptica, postsináptica y sus componentes. Los neurotransmisores se sintetizan en las terminales axónicas de las neuronas y se almacenan en scv y cuando un estímulo eléctrico sobrepasa un umbral de respuesta, se produce un potencial de acción (PA), el cual produce la movilización y fusión de las scv con la membrana presináptica para liberar el neurotransmisor, el cual a su vez se acopla a sus receptores específicos situados en la terminal postsináptica, los cuales pueden ser ionotrópicos o metabotrópicos, produciendo un potencial postsináptico ya sea excitador o inhibitorio (PPSE o PPSI). A su vez los co-transmisores, como los péptidos se sintetizan en el soma de la neurona, se almacenan en LDCV y se dirigen por transporte axónico rápido a través de los microtúbulos de los axones, hacia la Terminal presináptica en la cual debido a la entrada masiva e incremento del Ca^{2+} las LDCV se movilizan y liberan al péptido co-transmisor, el cual se acopla a sus receptores postsinápticos de tipo metabotrópico, produciendo una inhibición o facilitación de la transmisión sináptica.

- **Patrón morfológico de almacenamiento de transmisores y co-transmisores**

Las neuronas pueden presentar diferentes combinaciones de transmisores (neurotransmisores y neuromoduladores) y esta combinación de transmisores es lo que determina que en el sistema nervioso exista un código químico en las neuronas (Furness et al, 1989). Así las diferentes combinaciones de co-existencia pueden ser: **1)** un transmisor clásico + péptido(s) + ATP (Burnstock, 1976), **2)** ATP + transmisor clásico (Jo et al, 1999), **3)** un transmisor clásico + neurotrofinas (Lachmund A. et al, 1994), **4)** un transmisor clásico + el transmisor gaseoso NO (óxido nítrico, por sus siglas en inglés) o CO (monóxido de carbono) o Zn (Morales et al, 1995; Barañano et al, 2001); sin embargo, casi por regla general y en su mayoría, la combinación más común es **5)** un transmisor clásico + uno o más péptidos (Hökfelt et al, 1980; 1986; 1987; Lundberg 1996; Salio, 2006), aunque también puede ser **6)** un transmisor clásico + transmisor clásico (Jonas et al, 1998; Nicoll and Malenks 1998; Sulzer and Rayport 2000; Trudeau, 2003; Bergersen et al 2003; Li et al 2004; Seal and Edwards 2005; Trudeau and Gutiérrez 2007). Un ejemplo de co-existencia de dos transmisores clásicos se localiza en las fibras musgosas de las células granulares del hipocampo donde por medio de estudios fisiológicos, farmacológicos e inmunohistoquímicos se ha reportado que esas neuronas establecen sinapsis excitadoras glutamatérgicas con las células piramidales y las interneuronas inhibitoras locales de CA3, y que bajo ciertas condiciones pueden también liberar GABA (el principal transmisor inhibitor en el SNC) (Sandler & Smith 1991; Bergersen et al 2003; Gutiérrez et al, 2003; Gutiérrez 2005). Estos datos muestran la posibilidad que en las neuronas pueden co-existir y co-liberarse dos aminoácidos neurotransmisores, uno excitador y otro inhibitor, en este

caso parece que cada uno conlleva y ejerce un mensaje principal en las neuronas post-sinápticas.

En el caso de los ganglios simpáticos, tanto en las fibras preganglionares como en las neuronas post-ganglionares (Apéndice I) se ha demostrado la co-expresión de marcadores colinérgicos como la colin-acetil transferasa (enzima que participa en la biosíntesis de la ACh, ChAT) y el transportador vesicular de la acetilcolina (VACHT) junto con varios neuropéptidos (Lundberg and Hökfelt 1986), como la metionina encefalina (mENK) (Schultzberg et al, 1978; Schultzberg et al, 1979; Schultzberg 1984), la somatostatina (SOM) (Hökfelt et al, 1977), el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Lundberg and Hökfelt 1986), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Morales et al. 1995).

Ahora es formalmente aceptado que la co-existencia de transmisores es una característica común que expresan las neuronas y por tanto el postulado “una neurona, un neurotransmisor” es una excepción más que una regla tanto en el SNA como en el SNC. Se acepta que las terminales nerviosas presentan un patrón morfológico químico o de almacenamiento de transmisores caracterizado por la presencia de un transmisor clásico acompañado de otro transmisor clásico o de uno o más neuropéptidos, en donde los transmisores clásicos se almacenan en las scv y los neuropéptidos en las LDCV, (aunque en algunos casos las LDCV pueden almacenar también a los transmisores clásicos, hasta ahora los péptidos no se han encontrado en las scv) (Lundberg and Hökfelt 1983; Merighi, 2002; Burnstock 2004).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo a los conceptos de co-transmisión y al patrón morfológico de almacenamiento de transmisores aceptados actualmente, las terminales axónicas de las neuronas co-almacenan y co-liberan al transmisor clásico o principal y a uno o más co-transmisores (péptidos, entre ellos). Esta idea de co-almacenamiento de los mediadores sinápticos, aunque no del todo demostrado, ha prevalecido por largo tiempo hasta que varias evidencias mostraron que algunos péptidos como la mENK se expresa en terminales presinápticas preganglionares simpáticas (presumiblemente colinérgicas) que carecen de marcadores colinérgicos como la ChAT y el VAcHT (Lindh et al, 1986; Morales et al, 1995; Jiménez et al, 2002; Chanthaphavong et al, 2003), no obstante que estos péptidos co-localizan con ChAT en los somas de estas neuronas simpáticas (Kondo et al, 1985; Colombo-Bekmann, 1987).

Estos hallazgos discrepantes en la co-localización de transmisores entre los cuerpos celulares y la incompleta co-localización en las terminales axónicas de las NPS plantean al menos 3 posibilidades:

1. *Que las fibras y botones IR a péptidos y no a marcadores colinérgicos, no sean preganglionares simpáticos.*

Esta opción es descartada, ya que se ha demostrado que la denervación de las fibras preganglionares simpáticas en el GE del gato produce la desaparición de las fibras y botones peptidérgicos (Jiménez et al, 2002).

2. *Que existan dos poblaciones de NPS.*

Esta posibilidad implicaría la existencia de dos poblaciones, de NPS colinérgicas y no colinérgicas pero que ambas expresan IR a péptidos. En este caso algunas NPS podrían sintetizar únicamente péptidos o bien péptidos con otro transmisor diferente a la ACh. Esta posibilidad no puede descartarse del todo ya que aunque sí se ha demostrado el fenotipo colinérgico de las NPS (Kondo et al, 1985; Colombo-Bekmann, 1987) no se ha explorado específicamente la presencia de somas de NPS peptidérgicos y no colinérgicos.

3. *Las NPS pueden sintetizar en sus cuerpos celulares ACh y péptidos co-transmisores pero los segregan y almacenan en diferentes procesos axonales.*

Esta opción es viable en las NPS, ya que se ha encontrado co-existencia del péptido mENK con ChAT en los somas de las NPS (Kondo et al, 1985; Colombo-Benkmann, 1987; para revisión ver: Anderson et al, 2009), mientras que al nivel de sus terminales axónicas, el péptido mENK no siempre co-existe con ChAT ó VAcHT (Lindh et al, 1985; Morales et al, 1995; Jiménez et al, 2002; Chanthaphavong et al, 2003).

Hay trabajos, en otros sistemas y especies los cuales apuntan o sugieren la segregación de transmisores (Fisher et al, 1988; Sossin et al, 1990; Chun et al, 1994; Hattori et al, 1991; Sulzer et al, 1998; Blitz and Nusbaum et al, 1999; Joyce and Rayport, 2000; Sulzer and Rayport 2000; Landry et al, 2003; Nishimaru et al, 2005), sin embargo, aún no se ha demostrado de manera definitiva que las neuronas pueden separar o segregar diversos transmisores a diferentes procesos celulares.

En el caso de que existiera segregación de transmisores y co-transmisores en la sinapsis ganglionares, la co-transmisión se establecería mediante la liberación conjunta de los transmisores (transmisor clásico y co-transmisores) provenientes de distintos botones y terminales presinápticas, las cuales convergerían en un mismo blanco postsináptico.

Por otra parte, la segregación de transmisores implicaría la presencia de varicosidades preganglionares simpáticas que contengan péptidos pero no ACh. Dado que se ha reportado que los péptidos se almacenan en LDCV, es posible que: **I**) estas varicosidades peptidérgicas no colinérgicas almacenan péptidos en LDCV y transmisores clásicos diferentes a la ACh en scv; **II**) o bien que estas varicosidades carezcan de scv; o menos probable que **III**) estas varicosidades almacenen péptidos no vesiculizados o **IV**) que las scv almacenen péptidos. Para abordar estos puntos, caracterizamos la población vesicular de las varicosidades peptidérgicas tanto la colinérgicas como las no colinérgicas, por medio de la inmunodetección de dos tipos de proteínas vesiculares, la Syn considerada prácticamente específica para las scv (Thomas et al, 1988; Zimmerman et al, 1993; Bean et al, 1994; Nicholls, 1994; Burré and Volkandt, 2007) y la Syt la cual se ha detectado preferencialmente en las LDCV (Brose et al, 1992; Nicholls 1994; Burré and Volkandt, 2007).

HIPOTESIS

1. Existen dos poblaciones de NPS: colinérgicas y no colinérgicas y ambas expresan IR a péptidos.
2. Las NPS pueden sintetizar en sus cuerpos celulares ACh y péptidos co-transmisores pero segregarlos y almacenarlos a diferentes procesos axonales.
3. De haber segregación, los procesos axonales peptidérgicos no colinérgicos presentarían un diferente patrón vesicular.

Para abordar este problema y discernir entre las hipótesis antes descritas, nos planteamos los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

Con el propósito de discernir si existen dos poblaciones de neuronas, colinérgicas y no-colinérgicas, pero que ambas expresen péptidos, ó bien si las NPS pueden sintetizar ACh y péptidos y segregarlos al nivel de sus terminales axónicas; decidimos hacer un trabajo integrativo, donde estudiamos y exploramos conjuntamente los patrones morfológicos de almacenamiento de transmisores y péptidos co-transmisores en los somas, axones y botones terminales presinápticos de las NPS en las NPS de gato y rata. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos particulares:

- **Objetivos particulares**

1. Identificar por marcaje retrógrado en la médula espinal, las NPS que envían sus axones hacia los ganglios simpáticos, estelar (GE) de gato y cervical superior (GCS) de rata.
2. Explorar a nivel de la médula espinal, la existencia de somas de NPS inmunorreactivos (IR) a los péptidos neurotensina (NT), metionina encefalina (mENK), somatostatina (SOM), péptido del gen relacionado con la calcitonina (CGRP) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) con o sin IR a ChAT ó VACHT.
3. Estudiar la presencia y posible co-existencia de los péptidos neurotensina (NT), metionina encefalina (mENK), somatostatina (SOM), péptido del gen relacionado con la calcitonina (CGRP) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) con ChAT en los axones de las NPS que se dirigen a través del tronco torácico simpático (TTS) hacia los ganglios simpáticos.
4. Explorar a nivel de los botones y terminales presinápticas la presencia y posible co-existencia de los péptidos neurotensina (NT), metionina encefalina (mENK),

somatostatina (SOM), péptido del gen relacionado con la calcitonina (CGRP) o péptido intestinal vasoactivo (VIP) con ChAT o VACht.

5. Estudiar las características vesiculares de los botones y terminales peptidérgicos no colinérgicos, a través de la inmunorreactividad del péptido mENK con las proteínas vesiculares synaptofisina (Syn) para vesículas pequeñas claras y synaptotagmina (Syt) para vesículas de núcleo denso.

6. Investigar si la co-existencia de los transmisores se distribuyen homogéneamente o en regiones específicas, a lo largo del ganglio simpático; así como también si existe alguna relación con las neuronas post-ganglionares que inervan.

METODOLOGIA

En la primera parte del proyecto todos los experimentos fueron hechos en gatos adultos (n= 8), de uno u otro sexo (2.5–3.5 Kg.) los cuales se mantuvieron en jaulas para felinos con alimentación *ad libitum* con ciclos de luz oscuridad 12/12, en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB-UNAM). En la segunda parte del proyecto usamos ratas adultas (n= 6 para las dobles y n= 4 para el triple inmunomarcaje) macho de la cepa Wistar (200-300 grs). En ambos casos los animales de experimentación fueron tratados de acuerdo a todos los lineamientos establecidos por la comisión de bioética del IIB-UNAM.

- **Procedimientos Quirúrgicos**

Para explorar la localización y posible co-localización de ChAT, VACHT y péptidos en los somas preganglionares simpáticos y fibras y terminales axónicas los gatos se anestesiaron con pentobarbital sódico (35 mg/kg i.p.) y las ratas con xilazina (10 mg/kg i.m.) y ketamina (90 mg/kg i.m.).

En los experimentos en gatos para marcar retrógradamente las NPS, una vez anestesiados los gatos se entubaron endotraquealmente para aplicar en caso de ser necesario, ventilación artificial, se canalizó la vena femoral para la administración de las drogas y se midió la temperatura rectalmente, la cual se mantuvo entre 36 y 37°C con calor local, posteriormente se les practicó una cirugía en el área costal hasta encontrar el tronco torácico simpático, el cual se seccionó y se introdujo en un capilar lleno con fluorogold (3% en solución salina) por una hora, después de retirar el capilar y confirmar la tinción del extremo del nervio se cerraron las heridas. Mientras que en los experimentos donde se interrumpió el transporte axonal, se localizó el TTS y a nivel de

T3 se amarró con un hilo seda del número 6 y se cerraron las heridas y después de 24 horas los gatos se reanestasiaron para perfundirlos y extraer el cabo distal al GE.

Por otro lado, en los experimentos de bloqueo del transporte axonal de las NPS realizado en las ratas, se usó colchicina (de 10-16 μg a [1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en solución salina]), se inyectó intratecalmente la colchicina introduciendo un catéter dentro de la región atlanto-occipital, hasta alcanzar los segmentos cervicales de la médula espinal C6-C8. En los experimentos para la denervación preganglionar en ratas, el TTS se localizó y cortó 3-5 mm caudal a los ganglios simpáticos. Finalmente, en todos los casos después de las cirugías, los animales tuvieron cuidados post-quirúrgicos. Después de 2-4 días de haber realizado el marcaje retrógrado, 7 días del bloqueo del transporte axonal ó 2 días de la denervación preganglionar, los animales se re-anestesiaron, perfundieron y fijaron de acuerdo al siguiente procedimiento: una vez alcanzado el nivel profundo de anestesia, todos los animales se perfundieron vía transcardiaca con 100 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.01M, pH 7.4) por 3 min, seguida de 250 ml (para el caso de las ratas) ó 500 ml (en el caso de los gatos) de una solución fijadora, 100 ml en 3 min y el resto de la solución por 30-45 min (PB 0.1M más paraformaldehído 2% y ácido pícrico 0.18%, pH 7.4); después se extrajeron y disecaron los segmentos torácicos de la médula espinal de T2-T6 (tanto en los gatos como en ratas), el TTS a nivel de T3 y T6: el primer nivel se ubicó de 4-6 mm caudal al GE donde el ramo comunicante blanco se une al tercer segmento torácico (WR-T3) del TTS, y el segundo nivel del nervio se localizó 60-80 mm caudal al GE cercano a la salida del sexto segmento torácico (WR-T6), así como también los ganglios simpáticos (estelares en los gatos y cervicales superiores en las ratas).

Los segmentos de la médula espinal se colocaron en la misma solución fijadora para post-fijación toda una noche y posteriormente se crioprotegieron en sacarosa al 10, 15 y 30%, mientras que el TTS y los ganglios simpáticos sólo se colocaron en sacarosa al 30%, hasta que los tejidos alcanzaran el fondo de la solución para posteriormente procesarlos para inmunohistoquímica.

- **Inmunohistoquímica**

En un crióstato a -20 °C obtuvimos cortes longitudinales del ganglio y longitudinales y transversales de médula espinal de 14 µm de espesor. Todos los cortes se colectaron en laminillas cargadas eléctricamente (superfrost plus slides, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) y procesaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente para doble o triple marcaje, de acuerdo al siguiente procedimiento.

Para las inmunohistoquímicas dobles o triples, los cortes se pre-incubaron con suero de albúmina bovina (BSA, 10%) o suero de burro (DS, 5%) + BSA (5%) por 2 hrs, se incubaron toda una noche con los anticuerpos primarios contra la enzima ChAT, el transportador vesicular VACHT, péptidos o las proteínas Tau, Syn o Syt (Tabla 4), después los cortes se lavaron dos veces con PBS-Tritón X-100 (PBS 0.1M, Tritón X-100, 0.3%) para luego revelar al día siguiente con el anticuerpo secundario por 2 hrs. Para el caso de ChAT o VACHT se revelaron con biotina-avidina Texas red (TxR), mientras que los péptidos o las proteínas con isotiocianato de fluoresceína, FITC. En los triples inmunomarcajes revelamos ChAT con Cy5, mENK con FITC y Tau con TxR, o bien VACHT con biotina-estreptavidina Cy5, mENK con FITC y Syn con TxR (Tabla 4).

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para el inmunomarcaje

Antisueros	Tipos de anticuerpos	Acoplados a	Diluciones	Compañías
Primario				
VACHT (rata)	Cabra policlonal	---	1:100	Promega Corp. Madison WI, USA.
ChAT (humano)	Cabra policlonal	---	1:200	Millipore, Chemicon. Billerica, MA.
m-ENK (bovino)	Conejo policlonal	---	1:100	Millipore, Chemicon. Billerica, MA.
Synaptofisina (humano)	Conejo policlonal	---	1:200	Dako, Cytomation. Denmark.
Synaptofisina (sintético)	Ratón monoclonal	---	1:50	Dako, Cytomation. Denmark.
Synaptotagmina (sintético)	Ratón monoclonal	---	1:50	Millipore, Chemicon. Billerica, MA.
Tau (sintético)	Ratón monoclonal	---	1:100	Millipore, Chemicon. Billerica, MA.
Secundario				
α cabra IgG biotinilado	Caballo	Avidina DCS-Texas Red	1:100 1:200	Vector. Burlingame, CA, USA.
α cabra IgG biotinilado	Caballo	Streptavidina Cy5	1:200	Zymed. San Francisco CA, USA.
α conejo IgG	Rata	FITC	1:200	Zymed. San Francisco CA, USA.
α conejo IgG	Cabra	Texas Red	1:200	Vector. Burlingame, CA, USA
α ratón IgG	Cabra	FITC	1:200	Zymed. San Francisco, CA, USA.
α ratón IgG	Caballo	Texas Red	1:200	Vector. Burlingame, CA, USA.

Como controles negativos y para prevenir falsos positivos, algunos cortes se procesaron de acuerdo a todo el procedimiento de la inmunohistoquímica con excepción del anticuerpo primario. Además hicimos controles de preadsorción para los anticuerpos primarios, en los cuales incubamos toda la noche a 4° C, los anticuerpos primarios con sus antígenos controles correspondientes (a una concentración excedente de aproximadamente 10M), para ChAT la concentración de 0.1 μ M (Chemicon, Temecula, CA), mientras que 1 μ M para los péptidos y las proteínas Syn y Syt (Sigma, St Louis, MO y Abcam, Cambridge, MA).

- **Captura digital de las imágenes**

Una vez terminadas las dobles ó triples inmunomarcas los tejidos se montaron con medios especiales para fluorescencia (Vectashield Vector, Burlingame, CA; o Dako Fluorescent Mounting Medium, Dako Cytomation, Denmark) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse, E600) equipado con los filtros apropiados para los fluoróforos TxR (543 emisión y 650 excitación) FITC (488/520 nm), Cy5 (633-635/667) y UV, fluoro-gold (361/536 nm). En los experimentos realizados en los gatos las imágenes seleccionadas se capturaron digitalmente en un microscopio confocal (LSM 510 Pascal Zeiss microscope) equipado con un láser de argón/kriptón con un objetivo 100x de inmersión en aceite, de las regiones estudiadas se obtuvieron cortes ópticos seriados de 1-2 μm de grosor sobre el eje Z. Las imágenes se capturaron en dos o tres longitudes de onda correspondientes para TxR, FITC y Cy5, según fueran dobles o triples y se usó un fotomultiplicador para cada canal. Las imágenes se proyectaron por separado o sobreponiéndolas para lo cual se utilizaron pseudocolores como rojo para TxR, verde para FITC y azul para Cy5. Al final, las imágenes de confocal se procesaron en un plano bidimensional, donde la inmunomarca presente en los tejidos se observó con la sobreposición de las imágenes, generando los siguientes colores: amarillo (rojo-verde), violeta (rojo-azul), turquesa (verde-azul) y blanco (los tres colores).

En los experimentos realizados en ratas, las imágenes seleccionadas las capturamos en un microscopio DSU (Disc scanning unit, Olympus BSX51WI) cuya resolución en los cortes ópticos es muy similar a la de un confocal, cuenta además con una platina motorizada y controlada por un software (Stereo investigador, Micro Brighth Field, Inc., Willinston, VT). Las dobles inmunohistoquímicas se capturaron a una

magnificación de 20x y las triples inmunohistoquímicas a 60x. El microscopio DSU también está equipados con filtros apropiados para TxR, FITC y Cy5; una vez capturadas las imágenes de las dobles o triples inmunomarcas, se procesaron y analizaron digitalmente en el software Metamorph (v.7.5.6; Universal Imaging Corporation, Molecular Devices, Downington, PA), especializado para medir los niveles de co-existencia de los transmisores en las fibras y botones axónicos.

La re-construcción tridimensional del segmento del nervio preganglionar del TTS, se realizó a partir de un nervio inmunomarcado para ChAT (TxR) y NT (FITC), en el microscopio confocal se obtuvo una serie de 12 cortes ópticos de 0.25 μm de grosor cada uno y una vez obtenidas las imágenes se procesaron y visualizaron para darles volumen a las imágenes en los software Amira (Template Graphics Software, San Diego, CA) y SGI Onyx 350 visualization system (Silicon Graphics, Mountainview, CA). Las imágenes tridimensionales se obtuvieron con apoyo del personal experto en visualización y procesamiento de imágenes del Departamento de visualización tridimensional de la Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (DGSCA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

- **Muestreo, análisis de imágenes, cuantificación de la co-existencia y su estadística**

Para cuantificar los somas de las NPS que expresaban ChAT o VChT/péptidos de la médula espinal tanto en gato como ratas, seccionamos varios segmentos torácicos (T2-T6) de la médula espinal, tanto longitudinales como de transversales. Los cortes seleccionados al azar, los observamos, capturamos digitalmente y cuantificamos en el microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600); buscamos y contamos los somas

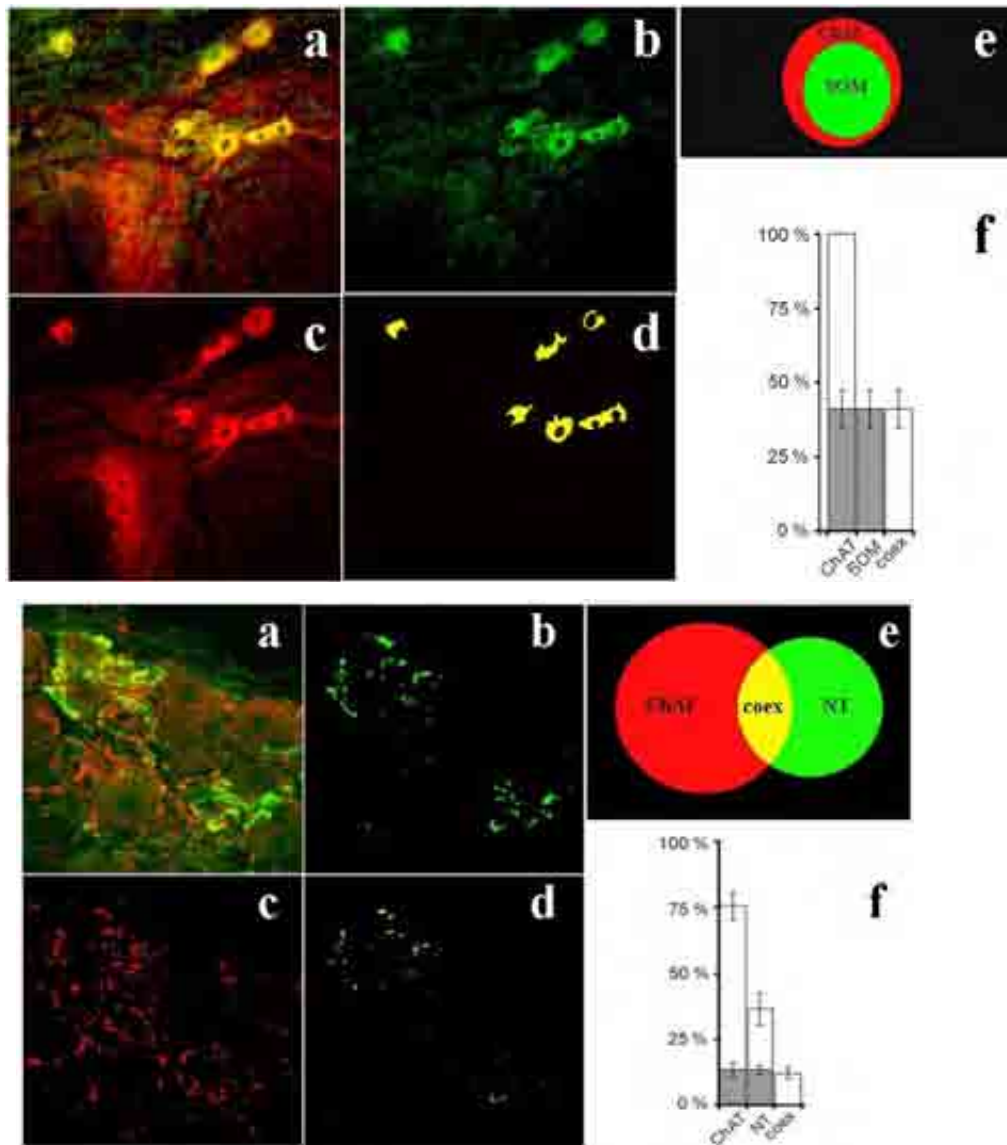
que se encontraban en el núcleo intermediolateral y que expresaban ChAT, VACHT, péptidos o bien ambas moléculas (ChAT/péptidos ó VACHT/péptidos).

Mientras que en los ganglios simpáticos (estelares de gato y cervicales de rata), para las fibras y botones axónicos IR a ChAT, VACHT, péptidos, Syn o Syt; obtuvimos cortes longitudinales de todo el tejido (aproximadamente 40-50 cortes de 14 μ m) y de los cuales elegimos de 4-5 cortes en diferentes profundidades sobre el eje Z (140–210, 350–420 y 560–630 μ m). En algunos ganglios cervicales capturamos toda la superficie del corte, a través de la captura digital con un microscopio DSU a una magnificación de 20x, mediante una platina motorizada y el software especializado del microscopio que re-construyó virtualmente todo el ganglio en los ejes X-Y. Cabe señalar que para evitar desplazamientos en las imágenes y falsos positivos de co-localización y localización independiente, decidimos capturar por separado las imágenes de cada canal (TxR, FITC ó Cy5) y al final generar las imágenes de superposición de los dos o tres canales de acuerdo a como hicimos las dobles o triples inmunohistoquímicas. Una vez que teníamos las imágenes de los ganglios re-construidos con las diferentes IR, en el software Methamorph (Universal, Imaging Corporation, Molecular Devices, Downington, PA) la especificidad de las fibras y botones axónicos IR la determinamos de acuerdo a la intensidad de luminosidad de su marca fluorescente (el umbral se seleccionó siempre mayor al promedio del ruido de fondo (background) + dos desviaciones estándar. Para determinar la cantidad total de IR a ChAT, VACHT, péptidos, Syn o Syt esta se expresó como porcentaje del área ocupada en todo el corte del ganglio.

En los experimentos con gatos, las dobles inmunomarcas las hicimos con las siguientes parejas: ChAT/mENK, ChAT/CGRP, ChAT/SOM y ChAT/VIP. Las fibras y botones axónicos inmunopositivos a ChAT y a cada péptido, las expresamos como el porcentaje de la población total de fibras positivas a ChAT o a cada péptido. Así mismo, calculamos el porcentaje de las fibras que co-expresaron ambos marcadores (Figuras 2 y 3).

Para cuantificar la co-existencia usamos la razón de fibras y botones que co-expresan ambas marcas, con respecto a las fibras que expresan cada una de las marcas, de tal forma que la razón 1 muestra la completa co-expresión, y la razón 0 representa localización independiente de transmisores (Figura 4).

En los experimentos con los ganglios cervicales superiores de rata, las dobles inmunomarcas fueron: ChAT/mENK, VACHT/mENK, VACHT/Syn, mENK/Syt y la triple, VACHT/mENK/Syn. Adicionalmente, estudiamos si el nivel de la co-existencia o segregación de los diferentes transmisores explorados se relaciona con el tipo de neuronas post-sinápticas que inervan; para ello dividimos el ganglio en 4 regiones de áreas equivalentes y estudiamos el nivel de co-existencia y segregación en cada región, las regiones fueron las siguientes: 1) rostral, relacionada con la salida del nervio post-ganglionar carótido externo; 2) rostral-medial y 3) caudal-medial, cercanas a la salida del nervio post-ganglionar carótido interno; y 4) caudal que incluye la región cercana a la entrada del nervio pre-ganglionar. De igual forma, las co-existencias las cuantificamos tal y como se describió en el párrafo anterior.



Figuras 2 y 3. Se muestra el método para determinar la co-existencia de los péptidos con ChAT tanto en los cuerpos celulares como fibras y botones axónicos de las NPS de la médula espinal. En ambas figuras en el panel izquierdo se presenta en **a** la imagen capturada por microscopia confocal que al separar los canales se obtiene en **b** la IR al péptido, en **c** a ChAT y en **d** se presenta la imagen procesada que muestra solamente los somas o fibras y botones donde co-existen ambas marcas. A la derecha (abajo) se muestran las gráficas en las cuales se representan los porcentajes de los somas o las fibras y botones IR totales a ChAT (círculos rojos y/o barras izquierdas en ambas gráficas), péptidos (círculos verdes y/o barras de en medio en ambas gráficas), y los somas y fibras y botones donde coinciden ambas IR (barra blanca izquierda de las gráficas e intersección amarilla en los círculos). Además en cada barra se indica el porcentaje de co-existencia con respecto a cada marca (región gris dentro de las barras).

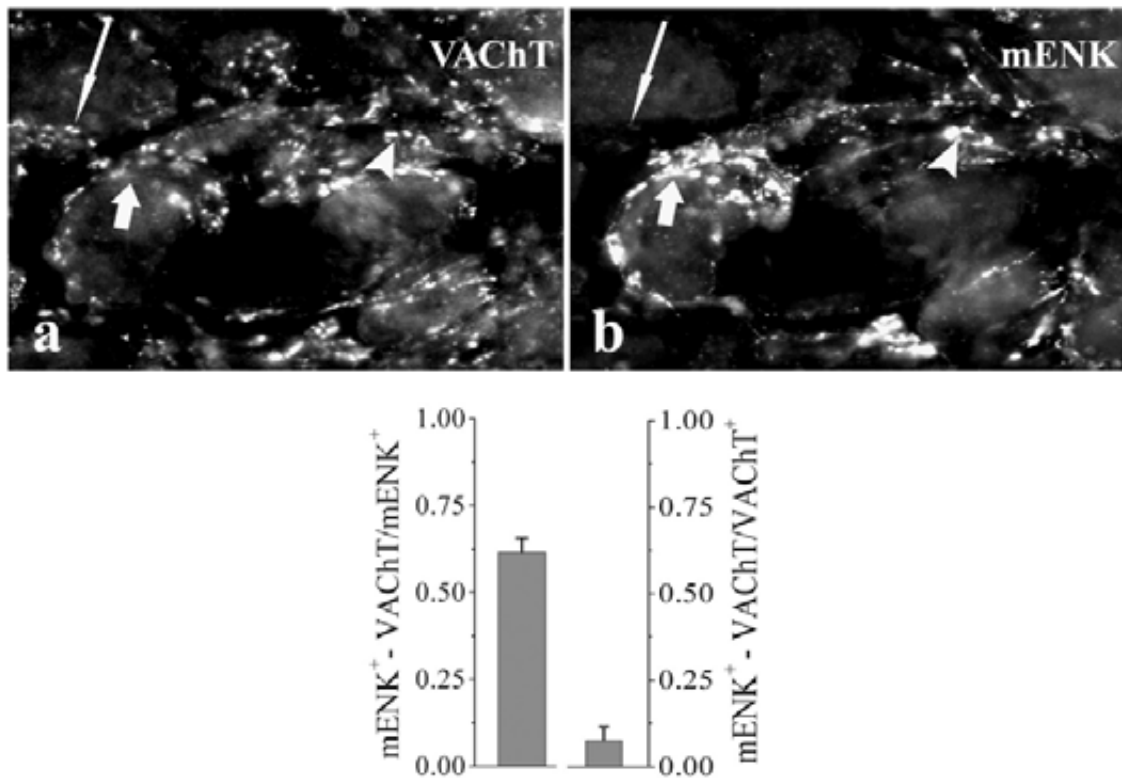


Figura 4. Imágenes y gráficas que ejemplifican el análisis y la cuantificación de las fibras y botones en el GCS de la rata. En la parte derecha se muestran imágenes de una región de ganglio de doble inmunomarcaje para VACHT y mENK (**a y b**), se observan fibras peptidérgicas (círculos punteados y flechas gruesas) que no co-expresan VACHT. En **c** se muestra la cuantificación de los datos antes mencionados; la gráfica representa la razón de la IR de los marcadores estudiados, donde los ejes de la izquierda muestran la razón entre fibras y botones que co-expresan mENK con VACHT sobre los que expresan solo mENK. Mientras que a la derecha la razón entre la co-existencia VACHT/mENK y la expresión de VACHT. Modificado de Sámano et al, 2009 (Neuroscience (2009), doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.06.010).

Finalmente, los datos que obtuvimos tanto en gatos como en ratas, los expresamos gráficamente como el promedio \pm SEM y las diferencias significativas entre los promedios de las co-existencias las evaluamos de acuerdo a la prueba T-student (Student's *t*-test) donde el nivel de significancia fue de $P < 0.05$; o con un análisis de varianza (ANOVA) para el caso de co-existencia entre las regiones del ganglio.

RESULTADOS

Los resultados que a continuación se presentan dieron lugar a dos publicaciones, Sámano et al, 2006 (*Synapse*, 60:295–306); Sámano et al, 2009 (*Neuroscience* (2009), doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.06.010). (Apéndice II).

1. **Presencia de neuronas preganglionares simpáticas (NPS) colinérgicas en las astas intermediolaterales de la médula espinal de gato y rata.**

Por marcaje fluorescente observamos en los núcleos intermediolaterales pars principalis (IMLp) de las astas laterales de la médula espinal, NPS positivas a ChAT en gato y a ChAT y VAcHt en rata. En cada núcleo encontramos neuronas ovoides, algunas pequeñas redondas o fusiformes y con un diámetro aproximado de 25-40 μm , estas neuronas se encontraron algunas veces aisladas, aunque la mayoría estaban en el núcleo IMLp en grupos de 6.7 ± 0.4 indicando que correspondían a neuronas preganglionares simpáticas. También localizamos somas IR a ChAT y VAcHt en las astas anteriores de la médula espinal pero dado su mayor tamaño muy probablemente corresponden a motoneuronas que inervan al músculo esquelético. La mayoría de las neuronas ChAT positivas localizadas en los núcleos intermediolaterales mostraron marca del trazador fluorogold, aplicado retrógradamente en el tronco torácico simpático ipsilateral, corroborando la naturaleza preganglionar de las neuronas estudiadas. (Figura 5). En todos los experimentos de gato y rata hicimos controles preadsorbiendo los anticuerpos primarios con el antígeno adecuado y los cuales fueron negativos, además para evitar falsos positivos en algunos cortes omitimos el anticuerpo primario.

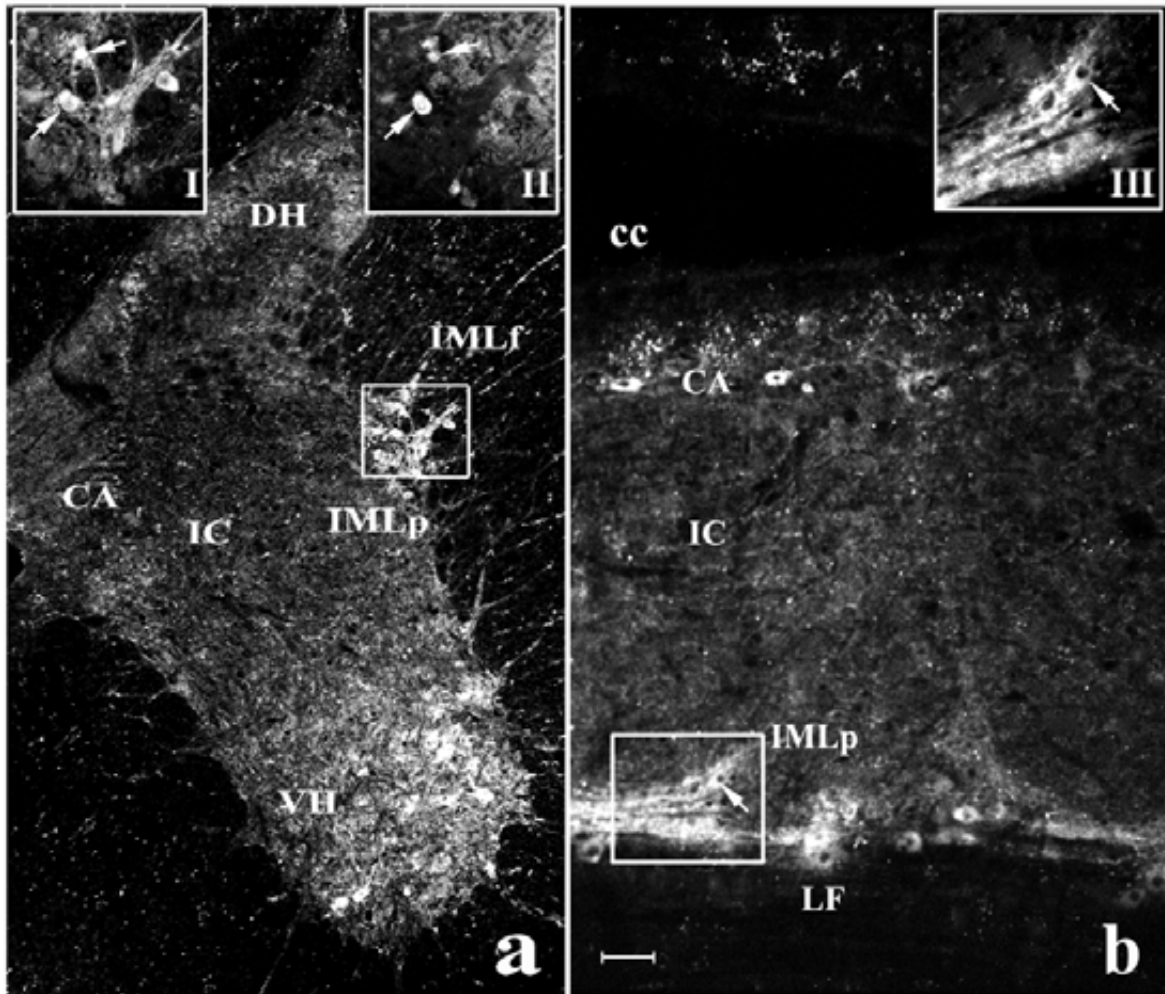


Figura 5. Fotografías donde se muestran las regiones de la médula espinal de gato, así como la localización de las NPS. En **a** se observa un corte transversal y en **b** uno longitudinal de médula espinal al nivel de T4. Los cuerpos celulares de las NPS IR a ChAT se detectaron principalmente en el núcleo IMLp del asta intermediolateral (las ampliaciones de estas neuronas se muestran en los recuadros I y III), algunas de estas neuronas fueron marcadas retrógradamente con el trazador fluoro-gold que se aplicó en el tronco torácico simpático ipsilateral (en los recuadros superiores izquierdos se observa el doble inmunomarcaje para ChAT (I) y fluorogold (II)). Las flechas señalan somas marcadas retrógradamente con fluorogold e IR a ChAT). En el asta ventral (VH) también detectamos somas de motoneuronas IR a ChAT las cuales no se marcaron con el trazador retrógrado. Núcleo intermediolateral pars principales (IMLp); pars funicularis (IMLf); asta dorsal (DH); área central autonómica (CA); núcleo intercalado (IC); canal central (cc) y funículo lateral (LF). Cal. 100 μ m, recuadros 40 μ m. Tomado de Sámano et al, Synapse 60:295-306, 2006.

2. Prácticamente todos los cuerpos celulares de las neuronas peptidérgicas fueron positivos a ChAT o VAcHT.

En la médula espinal de gato además de la IR a ChAT también detectamos en el asta intermediolateral cuerpos celulares preganglionares IR a NT, mENK, SOM, CGRP y VIP y en contraste con los cuerpos celulares IR a ChAT, el número de neuronas peptidérgicas por núcleo fueron escasamente 3.4 ± 0.3 NT; 2 ± 0.3 m-ENK; 2 ± 0.2

SOM; 2 ± 0.2 CGRP; y 4.3 ± 0.4 VIP. La IR de los péptidos en las somas preganglionares fue evidente, con excepción del péptido mENK; cabe mencionar que además de las NPS, también encontramos algunas neuronas presuntamente motoras en las astas ventrales positivas a NT o m-ENK. Mientras que en cortes transversales observamos en las astas posteriores o dorsales una gran cantidad de fibras varicosas IR a mENK y algunas otras a CGRP.

Por doble marcaje inmunofluorescente encontramos, tanto en cortes transversales como longitudinales de la médula espinal de gato, que la mayoría de los cuerpos celulares IR a los diferentes péptidos también expresaron IR a ChAT (Figura 6). Aunque encontramos muy pocas neuronas IR para algunos de los péptidos y no a ChAT, estas se localizaron siempre fuera de los núcleos autonómicos.

Tal y como lo esperábamos, de todos los cuerpos celulares ChAT-IR sólo unos cuantos expresaron a los péptidos explorados. Así tenemos que en el gato, de todos los somas cuantificados IR a ChAT sólo el $52.3 \pm 5\%$ co-expresó NT, el $32.8 \pm 7.1\%$ mENK, el $41 \pm 6.3\%$ SOM, el $37.3 \pm 2.6\%$ CGRP y el $45.1 \pm 5\%$ VIP (Figura 6). Estas neuronas se encontraron en los núcleos IMLp e IMLf de cortes transversales y longitudinales de la médula espinal de gato.

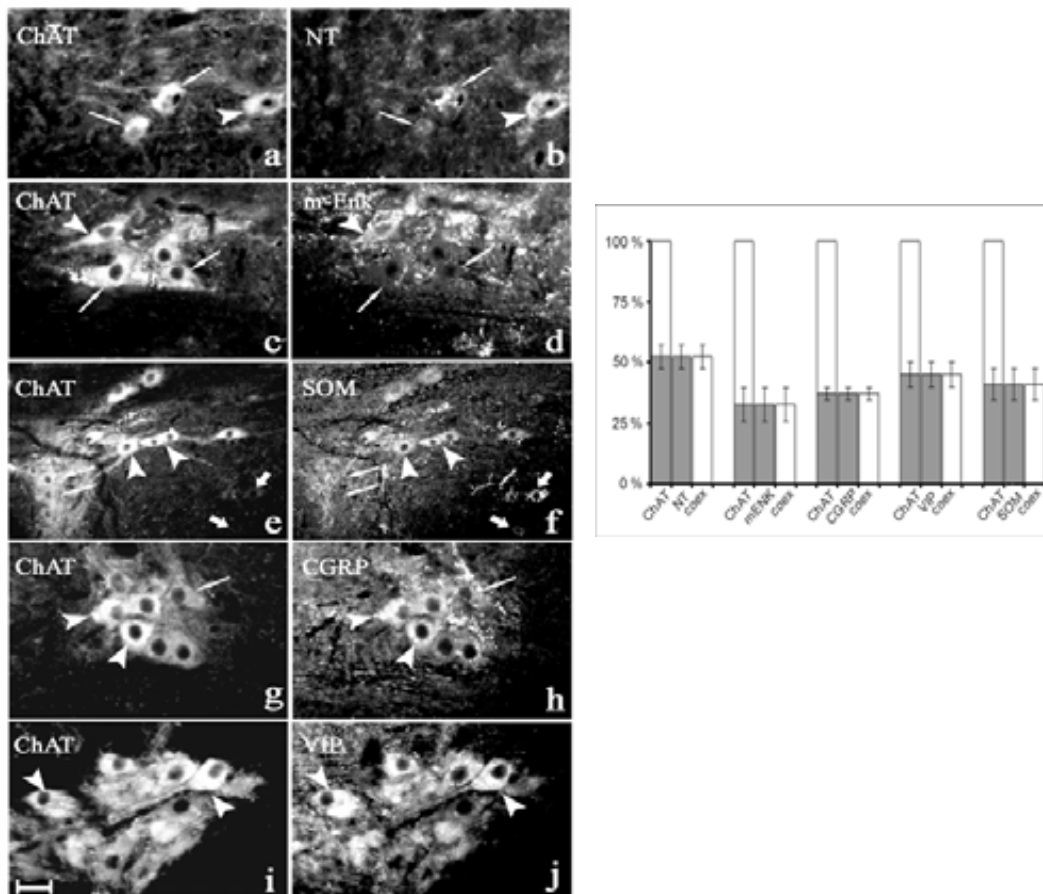


Figura 6. Fotografías de doble inmunomarcaje para ChAT y diferentes péptidos en cortes longitudinales (a-f) y transversales (g-j) de la médula espinal del gato. Todos los somas peptidérgicos contienen ChAT. Los cortes se muestran por parejas ChAT-NT (a,b); ChAT-m-Enk (c,d); ChAT-SOM (e,f); ChAT-CGRP (g,h) y ChAT-VIP (i,j). Todos los cuerpos celulares peptidérgicos localizados en el núcleo intermediolateral fueron positivos a ChAT (cabezas de flechas). Algunos somas fueron IR-ChAT y negativos a péptidos (flechas delgadas). Aunque algunos somas IR a SOM no fueron IR-ChAT, estos no se encontraron en el núcleo IMLp de las NPS. Cal. a-d y g-j, 50 μ m; e-f, 100 μ m. A la derecha está la gráfica (k) donde se muestra el porcentaje de los somas de las NPS IR a ChAT y a los diferentes péptidos. En el eje de las X se observan las parejas de ChAT con cada uno de los péptidos explorados y en el eje de las Y el % de somas IR para ChAT, para los péptidos y la co-existencia. A las columnas vacías que muestran los totales de IR se les sobrepone el sombreado que indica el porcentaje que mostró co-existencia con el otro mediador. Así, en ChAT y NT el 50% de los somas IR a ChAT fueron también IR a NT; mientras que prácticamente todos los somas IR a NT fueron IR a ChAT. Modificado de Sámano et al, Synapse 60:295-306, 2006.

Por otra parte, en los experimentos en la médula espinal de la rata, para hacer evidente e identificar en los cortes histológicos las NPS peptidérgicas e IR a VACHT, bloqueamos el transporte axonal con colchicina. Así, logramos identificar por dobles inmunomarcajes para ChAT/mENK y VACHT/mENK, al igual que el gato, algunos de los somas VACHT-IR también expresaron al péptido mENK ($32.8 \pm 7.1\%$). La mayoría de los somas encefalinérgicos se localizaron en el núcleo IMLp y prácticamente todos

fueron positivos a los marcadores colinérgicos ChAT y VACHT ($97.0 \pm 3.2\%$). Tal y como esperábamos de todas las NPS IR a ChAT o VACHT sólo algunas expresaron el péptido mENK (Figura 7). Tanto en los experimentos de gato y rata, hicimos los controles apropiados pre-adsorbiendo los anticuerpos primarios para los transmisores explorados, en donde desaparecieron las inmunomarcas.

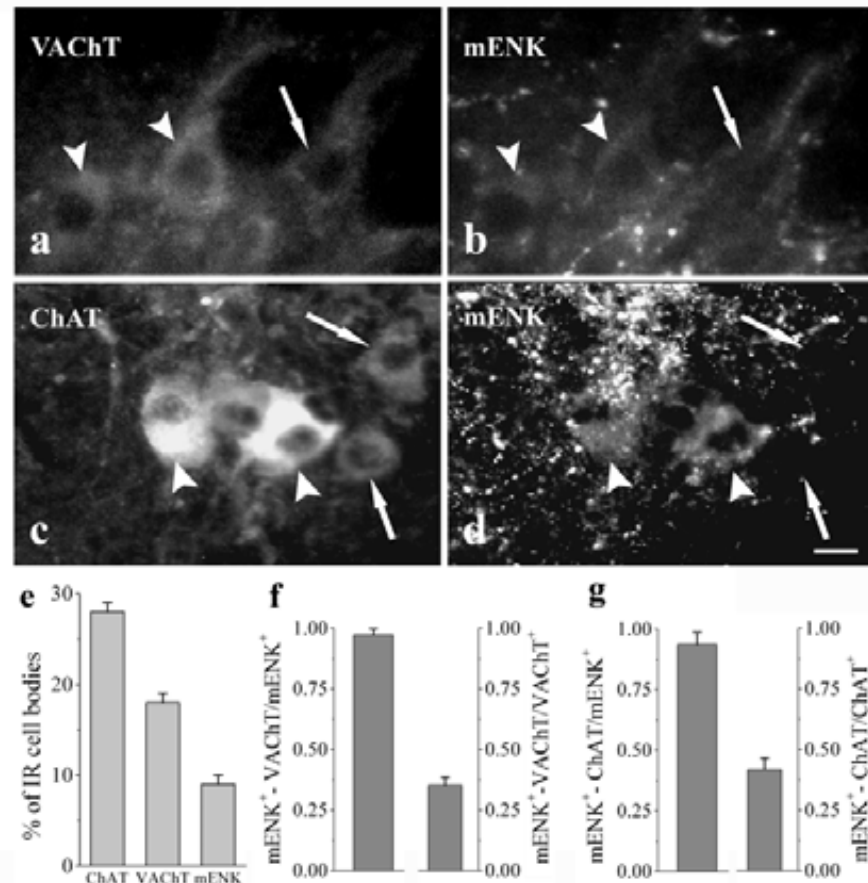


Figura 7. Imágenes de doble inmunofluorescencia de cortes transversales de médula espinal de rata. Prácticamente todos los somas peptidérgicos son colinérgicos. En **b** se muestran somas IR a mENK (cabezas de flechas), los cuales también lo son para VACHT (**a**); en **d** se muestra otro corte con somas peptidérgicos (cabezas de flechas) y positivos a ChAT (**c**). Algunos somas colinérgicos sin el péptido mENK también fueron identificados (a y c, flechas delgadas). Cal 25 μm (a-b), 50 μm (c-d). En la parte inferior se muestra el análisis cuantitativo de los datos, la gráfica **e**, muestra el porcentaje del total de los somas cuantificados en los cortes analizados; las gráficas **f** y **g** muestran la razón de la IR de los marcadores estudiados. En los ejes de la izquierda se muestra la razón entre los somas que co-expresan mENK con VACHT o ChAT, sobre los que expresan solo mENK. Mientras que en los ejes de la derecha la razón entre la co-existencia (VACHT/mENK o ChAT) y la expresión de VACHT o ChAT. En **f** observamos que de los somas IR a m-ENK, 97% también lo fueron a VACHT. En **g** de los somas IR a mENK, 93% fueron positivos a ChAT. Tomado de Sámano et al, 2009 (Neuroscience 163(1) 29:180-189).

3. Presencia de ChAT y VACHT en los ganglios simpáticos, estelar del gato y cervical superior de la rata.

Confirmamos la presencia de IR a ChAT en las fibras y terminales axónicas preganglionares de los ganglios simpáticos del gato y rata (Morales et al, 1995; Jiménez et al, 2002). Algunas de estas terminales se extienden varias micras a lo largo del ganglio, mientras que otras rodean a las células ganglionares.

Las fibras y botones axónicos preganglionares que detectamos positivos a ChAT y VACHT fueron abundantes y con una apariencia lisa y algunas otras varicosas (Figuras 9 y 10) (debido a que la distribución de la enzima ChAT dentro de las fibras y botones presinápticos es citoplasmática o alrededor de las vesículas sinápticas), mientras que la IR de VACHT también fue abundante y como una marca punteada, indicando que su localización es principalmente en los botones presinápticos. A pesar de que ChAT y VACHT difieren en su localización subcelular, tal y como se mencionó, ambas IR se distribuyen de manera abundante y marcan casi el mismo número de procesos axonales dentro de los ganglios ($17.9 \pm 1.3\%$ IR a VACHT y $18.4 \pm 0.3\%$ IR a ChAT, de la IR área total ganglionar $p = 0.7$; Figura 10e). Cuando analizamos la distribución de ambas marcas en cada una de las 4 regiones del ganglio (rostral, rostral-medial, caudal-medial y caudal), encontramos que su distribución fue heterogénea y con mayor inervación en la región rostral (Figura 10f).

Por otro lado, con el objetivo de corroborar que la marca de VACHT correspondía a botones presinápticos, decidimos explorar de manera conjunta VACHT con la proteína synaptofisina (Syn) (proteína constitutiva de las membranas de vesículas pequeñas claras [scv]) en el GCS y encontramos que Syn se localizó y observó en todo el ganglio como una marca punteada (muy parecida a VACHT) ocupando así un $19.9 \pm 1.4\%$ en toda la superficie del ganglio. En el doble marcaje de VACHT con Syn casi

todos los botones IR a VAcHT co-expresaron Syn ($95.7 \pm 4.2 \%$), mientras que el $79.6 \pm 4.4\%$ de los botones IR a Syn contenían VAcHT (Figura 8). Cuando denervamos el nervio preganglionar, alrededor del 95% de las fibras IR a ChAT, todos los botones positivos a VAcHT y a Syn desaparecieron, confirmando su origen preganglionar (Figura 11). Además en todos los experimentos en los ganglios simpáticos de gato y rata hicimos los controles de preadsorción de los anticuerpos primarios y en donde desaparecieron las IR para los marcadores.

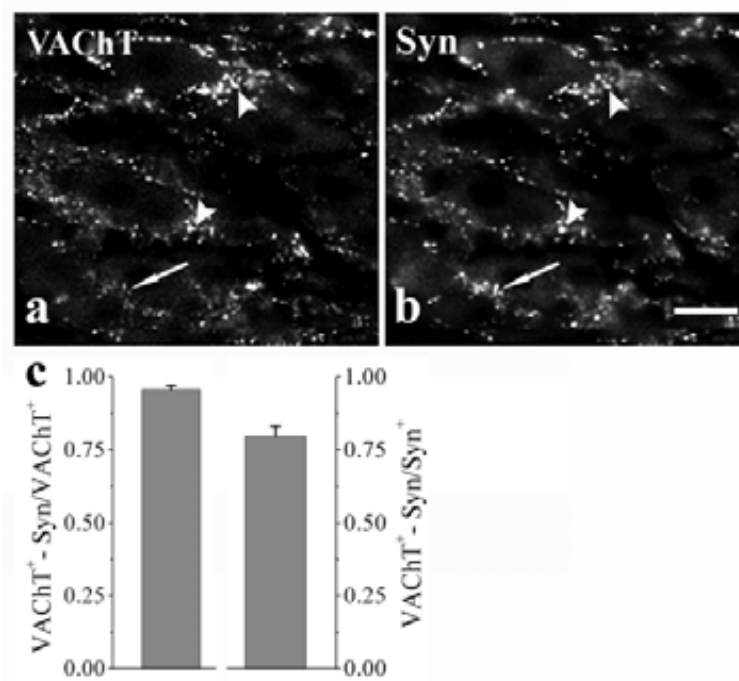


Figura 8. Imágenes de doble inmunofluorescencia para VAcHT y Synaptofisina (Syn). Los botones IR a VAcHT expresan casi en su totalidad la proteína vesicular Syn. En **a** se muestran IR a los botones axónicos positivos a VAcHT, en **b** a Syn; en ambas imágenes las cabezas de flechas muestran los botones axónicos en los cuales el marcador colinérgico coincide con la proteína de vesículas claras. Cal 5 μ m. En la parte inferior de las imágenes, está la gráfica de esos datos; en la gráfica **c** el eje de la izquierda muestra la razón entre los botones que co-expresan VAcHT con Syn sobre los que expresan solo VAcHT. Mientras que a la derecha la razón entre la co-existencia (Syn-VAcHT) y la expresión de solo Syn. Así, observamos que de los botones IR a VAcHT 95% también lo fueron a Syn; y de los botones IR a Syn, 79% fueron positivos a VAcHT. Tomado de Sámano et al, 2009 (Neuroscience 163(1) 29:180-189).

4. En los ganglios simpáticos, más de la mitad de las fibras y botones axónicos preganglionares son peptidérgicos y no colinérgicos.

Tanto en el GE de gato como en GCS de la rata localizamos IR a los péptidos NT, mENK, SOM, CGRP y VIP en las fibras y botones axónicos preganglionares (GE)

(Figura 9), así como mENK (GCS) (Figura 10). Muchas de las fibras peptidérgicas se distinguen como una red de fibras varicosas que se encuentran rodeando a los cuerpos celulares de las neuronas ganglionares.

Con marcaje doble simultáneo contra ChAT y los péptidos encontramos, fibras y botones con diferentes patrones de IR; unas positivas sólo a ChAT, algunas otras sólo a los péptidos explorados y otras más donde co-existían ambas moléculas (péptido y ChAT). Como era de esperarse, no todas las fibras IR a ChAT fueron positivas a péptidos, así tenemos que de la población IR a ChAT fueron simultáneamente IR a NT el $12 \pm 2.2\%$, mENK el $10 \pm 1.3\%$, SOM el $10.3 \pm 1.2\%$, CGRP el $4.1 \pm 1\%$ y VIP el $7.2 \pm 3.3\%$ (Figura 10).

Contrario a los datos que encontramos de co-existencia de péptidos con ChAT en los somas de las NPS, en las fibras y botones axónicos del GE detectamos un número considerable de varicosidades IR a péptidos pero no a ChAT. Así encontramos por doble inmunomarcaje que para ChAT/NT solo el $12.0 \pm 2.2\%$ expresaron ambos marcadores, para mENK el $44.1 \pm 9.2\%$, SOM $50.0 \pm 4.6\%$, CGRP $16.1 \pm 3.4\%$ y VIP $25.5 \pm 5.5\%$ (Figura 9). Adicionalmente, en las neuronas ganglionares detectamos IR a ChAT, las cuales se encontraron rodeadas por terminales axónicas preganglionares también IR a ChAT; de igual forma para los péptidos mENK, CGRP y VIP detectamos células ganglionares positivas y en donde la IR se observó muy intensa y distribuida en todo el citoplasma de las células ganglionares.

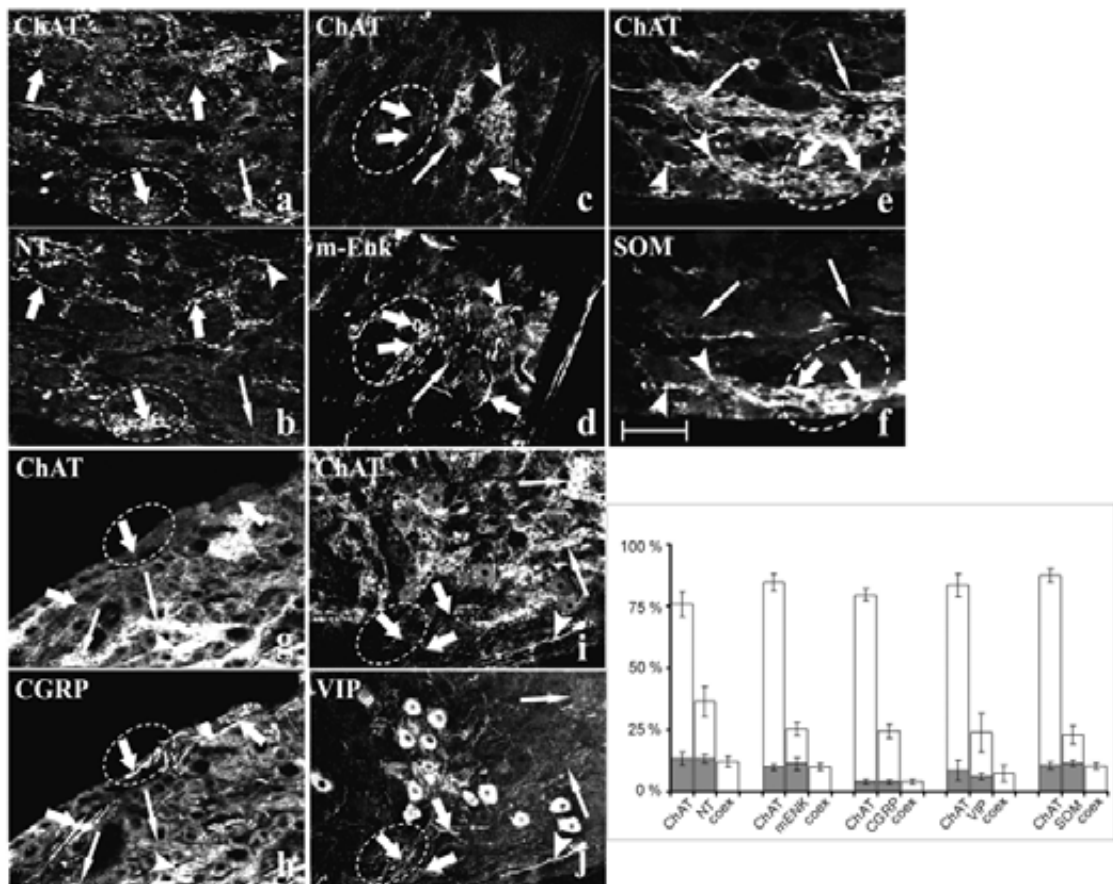


Figura 9. Fotografías de doble inmunomarcaje para ChAT y diferentes péptidos en cortes longitudinales del GE del gato. Alto porcentaje de fibras y botones axónicos no presentan IR a ChAT. Se muestran fibras y botones axónicos de las NPS. Los cortes se procesaron en parejas, ChAT-NT (a-b); ChAT-mENK (c-d); ChAT-CGRP (e-f); ChAT-VIP (g-h); ChAT-VIP (i-j). En todos los casos se encontró escasa co-existencia de los péptidos con ChAT, los círculos muestran zonas de fibras peptidérgicas que no fueron IR a ChAT (flechas gruesas). Hay fibras IR a ChAT y negativas a péptidos (flechas delgadas) y otras pocas donde co-existen ambas IR (cabezas de flechas). Cal. a-b, 50 μ m; c-j, 100 μ m. En la parte de abajo se muestra la gráfica del análisis de las fibras y botones axónicos IR a ChAT y los diferentes péptidos. En el eje de las X se observan las parejas de ChAT con cada uno de los péptidos explorados y el eje de las Y el % de las fibras IR para ChAT a cada uno de los péptidos y su co-existencia. A las columnas que muestran los totales de IR se les sobrepuso el porcentaje de co-existencia con el otro mediador (parte sombreada). Modificado de Sámano et al, *Synapse* 60:295-306, 2006.

En el GCS de la rata tal y como esperábamos para las fibras positivas a mENK representaron una pequeña proporción en todo el ganglio ($1.4 \pm 0.2\%$) con una distribución heterogénea y con un gradiente hacia las regiones rostral-caudal (Figura 10 e -f). Los resultados de la doble inmunomarca en el GCS de la rata para mENK/ChAT y mENK/VACHT fueron similares a los reportados en el GE del gato; ya que de las fibras y botones encefalinérgicos alrededor del $40.0 \pm 4.2\%$ fueron sólo IR a mENK y no a ChAT o VACHT (Figura 10g-h).

La denervación del nervio preganglionar nos confirmó el origen preganglionar de las fibras encefalinérgicas, ya que la transección del nervio removió alrededor del 99.5% de las fibras encefalinérgicas dentro del ganglio. (Figura 11).

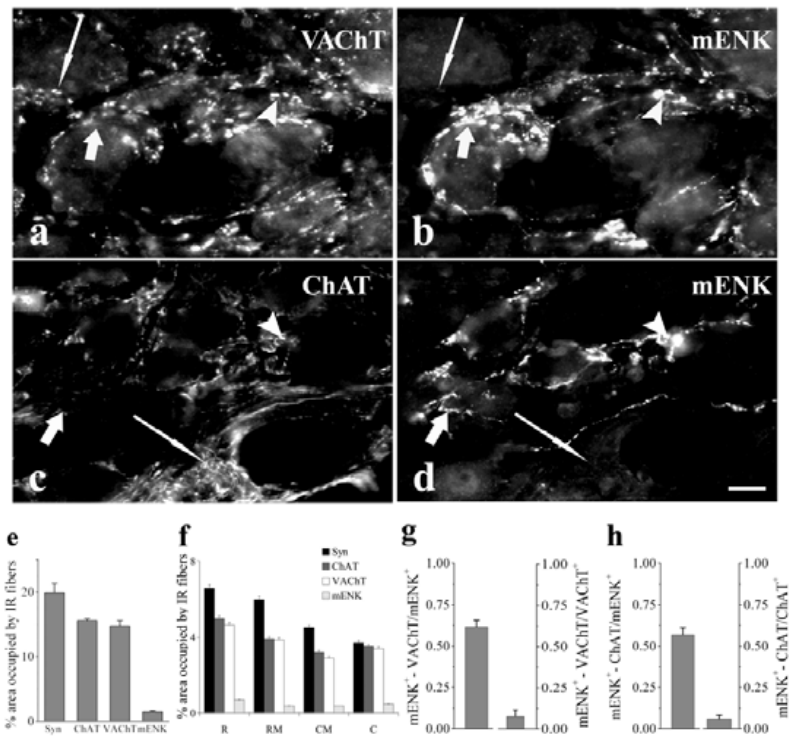


Figura 10. Imágenes de doble inmunomarcaje de una región de ganglio. Alrededor del 40% de fibras y botones axónicos no son colinérgicos. En **b** se muestran fibras IR a mENK (círculos punteados y flechas gruesas) las cuales son negativas a ChAT (**a**). En **d** se muestra otro corte IR a mENK y en el cual también se observan fibras peptidérgicas (círculos punteados y flecha gruesas) que no co-expresan VAcHT (**c**). Cal. 5µm (a-b), 10 µm (c-f). En la parte de debajo de las figuras se muestra la cuantificación de los datos antes mencionados; en **e** se muestra el porcentaje de toda la IR observada, de los marcadores explorados, en todo el ganglio. En **f** se muestra la distribución independiente por región, de cada una de las IR de los marcadores que exploramos. Las gráficas **g** y **h** muestran la razón de la IR de los marcadores estudiados. Nuevamente los ejes de la izquierda muestran la razón entre fibras y botones que co-expresan mENK con ChAT o VAcHT sobre los que expresan solo mENK. Mientras que a la derecha la razón entre la co-existencia (ChAT o VAcHT/mENK) y la expresión de ChAT o VAcHT. La gráfica **f** muestra que de los botones IR a mENK, 61% también lo fueron a ChAT, y en **g** de los botones IR a mENK y a VAcHT, 62% fueron positivos a VAcHT. R, rostral; RM, rostral medial; CM, caudal medial y C, caudal. Tomado de Sámano et al, Neuroscience, Tomado de Sámano et al, 2009 (Neuroscience 163(1) 29:180-189).

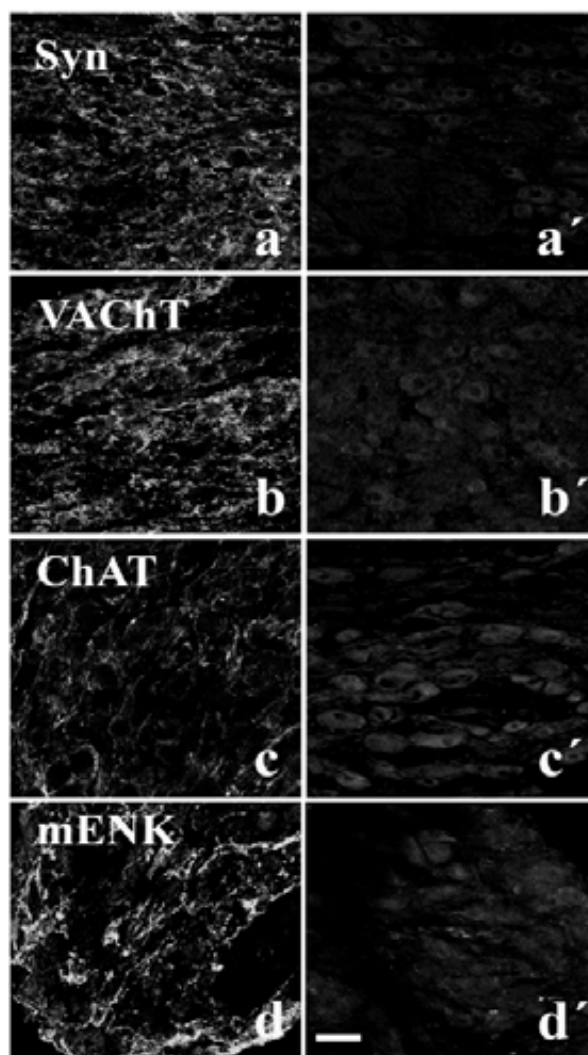


Figura 11. Imágenes de inmunofluorescencia de ganglios control y denervados preganglionarmente. Al denervar el tronco torácico simpático las fibras preganglionares IR a los transmisores desaparecieron. Del lado izquierdo se muestran imágenes de fibras IR a la proteína Syn (**a**), los marcadores colinérgicos VAcHT y ChAT (**b-c**) y al péptido mENK (**d**). A la derecha se presentan las imágenes de los ganglios una vez que se denervó el nervio preganglionar, se distingue que prácticamente las fibras IR a los diferentes marcadores desaparecieron (**a'-d'**), confirmando su origen preganglionar. Cal 100 μ m. Tomado de Sámano et al, 2009 (Neuroscience 163(1) 29:180-189).

5. Localización independiente de ChAT y péptidos en el tronco torácico simpático de gato.

Considerando que los péptidos co-existen con ChAT en los cuerpos celulares de la médula espinal pero no en su totalidad en las fibras y botones axónicos dentro de los ganglios simpáticos y que además las NPS tienen un solo axón, decidimos explorar por doble inmunomarcaje la localización y transporte de los péptidos con ChAT en los axones de las NPS dentro del TTS de gato. Detectamos tanto en cortes transversales

como longitudinales de las regiones T3 y T6 del TTS, IR a ChAT y los péptidos NT, mENK, CGRP, VIP, con excepción de SOM el cual no alcanzó niveles detectables. El número total de axones IR a ChAT se detectaron distribuidos homogéneamente siendo el $75.7 \pm 1.5\%$ con respecto al área total del nervio, mientras que para la IR de cada uno de los péptidos, NT, mENK, CGRP y VIP el número de axones equivale al 34.9 ± 1.9 , 27.8 ± 2.8 , 35 ± 6.1 y $30.7 \pm 2.6\%$ del total de los axones marcados.

Con la finalidad de corroborar que las marcas inmunofluorescentes correspondían al axoplasma de los axones preganglionares, los cortes del TTS se contratiñeron con el trazador fluorogold el cual inesperadamente marcó la vaina de mielina de los axones, de tal forma que al observar el doble marcaje ChAT (TxR), fluorogold (UV) logramos constatar que los puntos inmunofluorescentes de ChAT siempre se detectaron dentro de los anillos de mielina correspondiendo al axoplasma de las fibras nerviosas (Figura 12 a-c).

Tomando en cuenta que los axones de las NPS no ramifican antes de entrar a los ganglios simpáticos, esperábamos encontrar que en los axones los niveles de co-existencia entre los péptidos y ChAT fueran altos, sin embargo, las IR a ChAT y a los péptidos se localizaron independientemente en diferentes axones del TTS. Así, el análisis de ChAT con NT reveló que sólo en el $7.6 \pm 1.3\%$ de los axones co-existieron ambas marcas, el valor representa el $10.3 \pm 1.6\%$ con respecto a los axones IR a ChAT y el $22.3 \pm 4.4\%$ con respecto a todos los axones IR a NT; mientras que para el resto de los péptidos la co-existencia con ChAT también fue baja: $2.9 \pm 0.4\%$, $10.8 \pm 2.8\%$ y $8.0 \pm 1.9\%$ para m-ENK, CGRP y VIP respectivamente. Los cuales representan el $3.9 \pm 0.6\%$, $15.3 \pm 4.3\%$ y $10.2 \pm 2.3\%$ con respecto a todos los axones positivos a ChAT y el

10.2 ± 1.0 %, 28.4 ± 3.7 % y 25.2 ± 5.3% con respecto a todos los axones positivos a m-ENK, CGRP y VIP, respectivamente (Figuras 12 d-p).

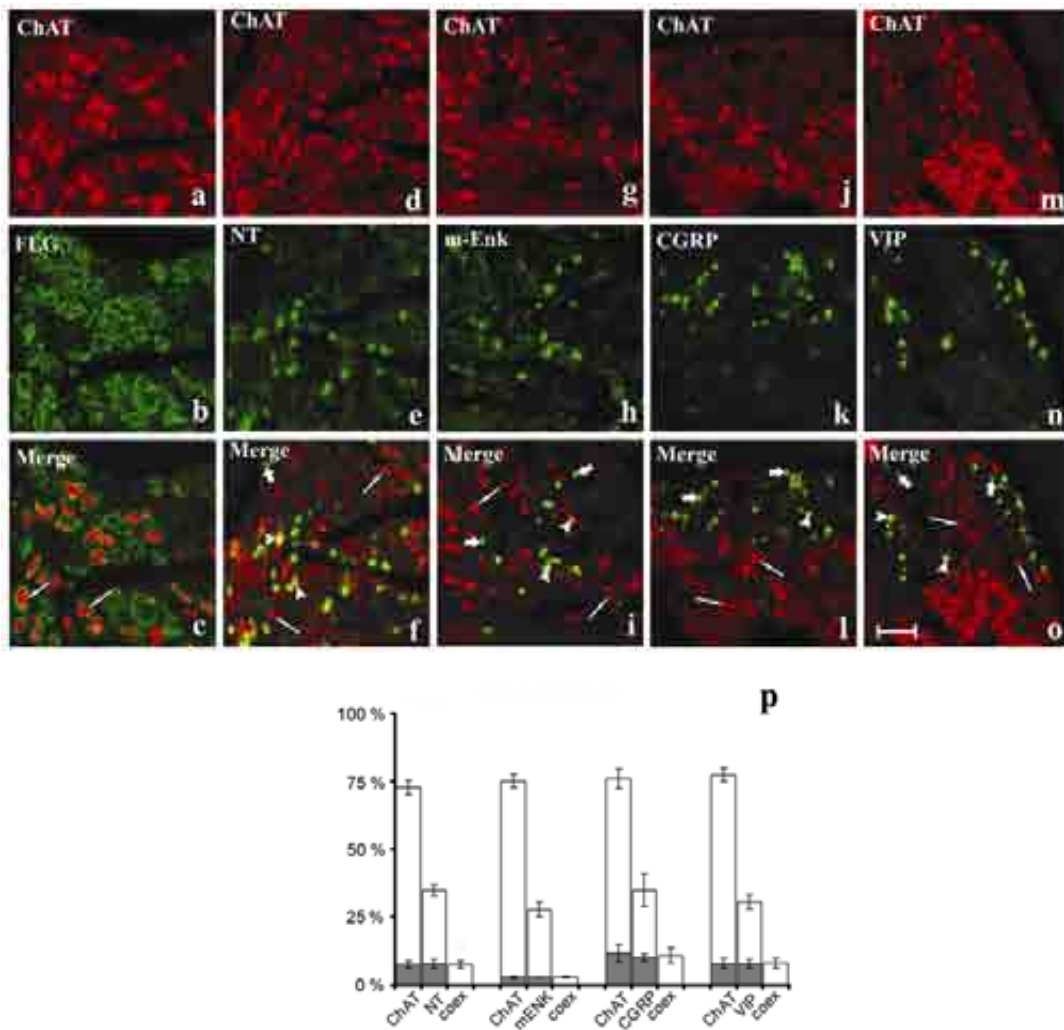


Figura 12. Micrografías de dobles inmunohistoquímicas para ChAT y péptidos en cortes transversales del TTS, a nivel de T3 caudal al GE de gato. Imágenes capturadas por microscopía confocal, del lado izquierdo se muestra un corte del axoplasma IR a ChAT (**a**), con la mielina contrastada con fluorogold (FLG, **b**) y la sobreposición de ambos canales (**c**) en la cual se distingue que ChAT se encuentra dentro de los anillos de mielina. Hacia la derecha se muestran las dobles inmunohistoquímicas para ChAT/NT (**d-f**), ChAT/m-ENK (**g-i**), ChAT/CGRP (**j-l**) y ChAT/VIP (**m-o**). En cada una de las imágenes merge se observan axones IR a ChAT y negativo a péptidos (puntos rojos, flechas delgadas), IR a los péptidos y negativos a ChAT (puntos verdes, flechas gruesas) y algunos cuantos axones donde co-existen ambas inmunomarcas (puntos amarillos, cabezas de flechas). No detectamos IR al péptido SOM en los axones. Cal. 5µm (**a-c**) y 10 µm (**d-o**). En la parte de abajo se muestra la gráfica del análisis de las fibras del TTS IR a ChAT y los diferentes péptidos. En el eje de las X se observan las parejas de ChAT con cada uno de los péptidos explorados y en el eje de las Y el % de las fibras IR para ChAT a cada uno de los péptidos y su co-existencia. En las columnas que muestran los totales de IR se les superpuso el porcentaje de co-existencia con el otro mediador (parte sombreada). Tomado y modificado de Sámano et al, Synapse 60:295-306, 2006.

En los cortes longitudinales del TTS, observamos que las IR de ChAT y los péptidos se distribuyeron principalmente de forma separada a lo largo de las fibras. Así, por medio de doble inmunomarcaje, análisis confocal y reconstrucción tridimensional, tanto ChAT como el péptido NT se distribuyeron y marcaron sólo segmentos a lo largo

de los axones (Figura 13 a-c). Para explorar si este patrón de segmentación era consecuencia del transporte axonal sucesivo de los transmisores, ligamos el nervio preganglionar para interrumpir el transporte axonal de ChAT y los péptidos y lograr que se acumularan en el sitio de la ligadura. Mediante esta maniobra experimental en efecto logramos ChAT y NT se acumularan en el nervio, mostrando un claro un incremento en la co-existencia de las moléculas ($19.0 \pm 3.0\%$), con respecto a los nervios sin ligadura ($7.6 \pm 1.3\%$), el análisis estadístico mediante la prueba Student's *t*-test confirmó que los datos son significativamente diferentes ($p < 0.05$, $n=5$) (Figura 13 d-g).

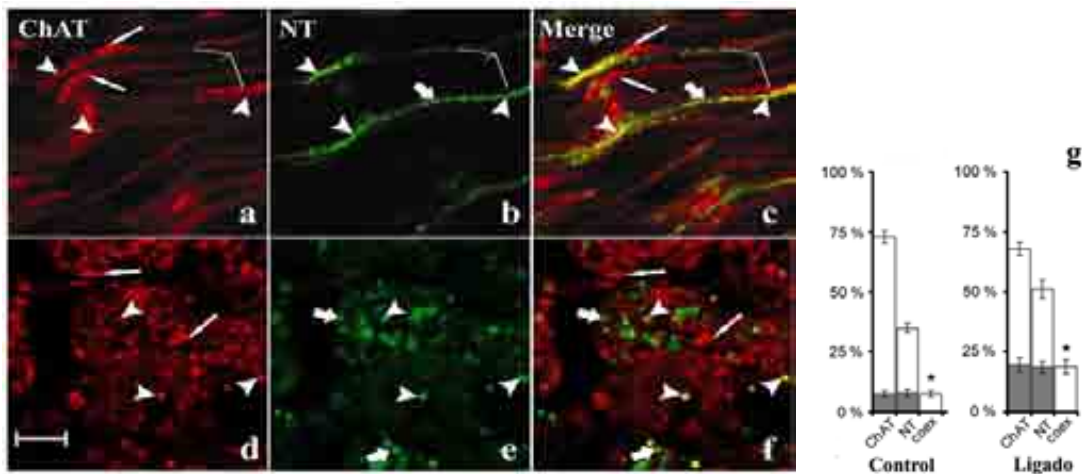


Figura 13. En la parte superior se muestra la reconstrucción tridimensional de una serie de 12 cortes ópticos de 0.25 μm cada uno, son secciones longitudinales del TTS capturados en el eje Z por microscopía confocal y doblemente inmunomarcados para ChAT y NT (a-c). En la parte inferior son imágenes de microscopía confocal de cortes transversales del TTS ligado e inmunomarcado para ChAT/NT (d-f). En la reconstrucción 3-D de los axones en cortes longitudinales, se observan diferentes zonas o segmentos donde se encuentra IR a ChAT (rojo, flechas delgadas), a NT (verde, flechas gruesas) y unas cuantas zonas donde co-existen ambas IR (amarillo, cabezas de flecha). Para identificar la orientación en las imágenes 3-D, los ejes se muestran en la parte superior derecha de las figuras a-c. En la parte inferior se muestran las imágenes de una doble inmunohistoquímica para ChAT/NT después de haber interrumpido el transporte axonal en el TTS. Se distinguen más axones en donde co-localizan ambas marcas (puntos amarillos, cabezas de flecha en f). Cal. a-c 4 μm y d-f 10 μm. A la derecha se muestran las gráficas del análisis de las co-existencias de ChAT/NT antes y después de haber ligado el TTS. En el eje de las X se observa la pareja de ChAT/NT y su co-existencia, y en el eje de las Y el % de las fibras IR para ChAT, NT y las co-existencias. Se muestra el % de la co-existencia de NT/ChAT que incrementó después de haber ligado el TTS, con respecto al TTS sin ligadura ([control], asterisco, $P < 0.05$, Student's *t*-test). En las columnas que muestran los totales de IR se les sobrepuso el porcentaje de co-existencia con el otro mediador (parte sombreada). Tomado y modificado de Sámano et al, Synapse 60:295-306, 2006.

6. Análisis por microscopía confocal de una fibra peptidérgica no colinérgica.

Debido a que encontramos una proporción alta de fibras y botones peptidérgicos no colinérgicos y considerando que las NPS tienen un solo axón que se ramifica y donde sus botones y terminales axónicas establecen sinapsis con las neuronas ganglionares dentro de los ganglios simpáticos, entonces decidimos analizar detalladamente por microscopía confocal una de las fibras peptidérgicas no colinérgicas,

logrando identificar en el GE de gato algunas fibras axónicas varicosas que por su morfología muy probablemente corresponden a fibras preganglionares; en estas pudimos observar botones (varicosidades) que distinguimos con diferentes IR a ChAT, NT y otros más donde co-localizan ambas IR. En la figura 14 se muestra una de estas fibras.

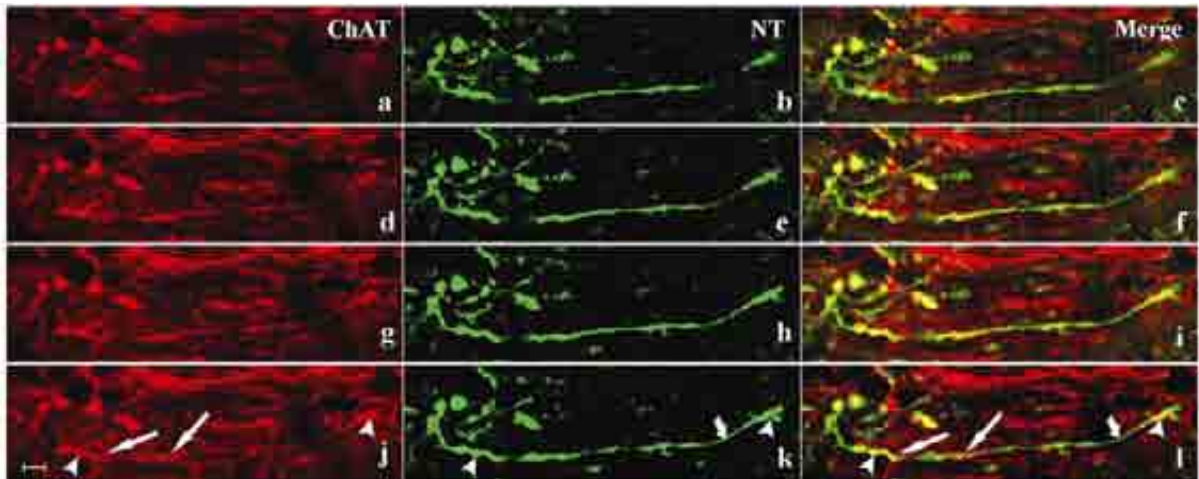


Figura 14. Imágenes capturadas por microscopía confocal de doble inmunomarcaje para ChAT y NT de una probable fibra única varicosa dentro GE del gato. Figura compuesta por una serie de cortes ópticos de 0.25 μm capturados a través del eje Z e IR a ChAT (**a,d,g,j**) y NT (**b,e,h,k**). A lo largo de la fibra preganglionar se observan diferentes segmentos (varicosidades) positivas a ChAT en rojo (flechas delgadas), otras a NT en verde (flechas gruesas) y otras donde coinciden ambas marcas en la imagen merge en amarillo (**c,f,i,l**) (cabezas de flechas), Cal. 5 μm . Tomado de Sámano et al, Synapse 60:295-306, 2006.

En cortes del GCS de la rata tratamos de marcar e identificar únicamente algunas fibras axónicas mediante la proteína α -Tau (proteína que se asocia dentro de los axones a los microtúbulos y la cual se expresa únicamente en axones y no en dendritas y cuerpos celulares). Los cortes de ganglio los procesamos por triple inmunohistoquímica contra ChAT/mENK/Tau y los revelamos con diferentes fluorocromos ChAT (Cy5), mENK (FITC) y Tau (TxR) para analizar los cortes por microscopía de epifluorescencia y confocal. Efectivamente la IR a Tau la detectamos solo en fibras axónicas dentro del GCS y en el microscopio confocal localizamos e intentamos seguir a mayor aumento y en la profundidad del eje Z, una sola fibra axonal IR a ChAT/mENK/Tau, logrando obtener imágenes muy sugerentes, en donde

distinguimos fibras marcadas con Tau y las cuales presentan segmentos positivos a ChAT, mENK y otros más donde coinciden ChAT y mENK (Figura 15). Cabe señalar que aunque Tau marcó muchas fibras axonales, no logramos identificar por completo una sola fibra, solo segmentos IR a Tau, ChAT y mENK.

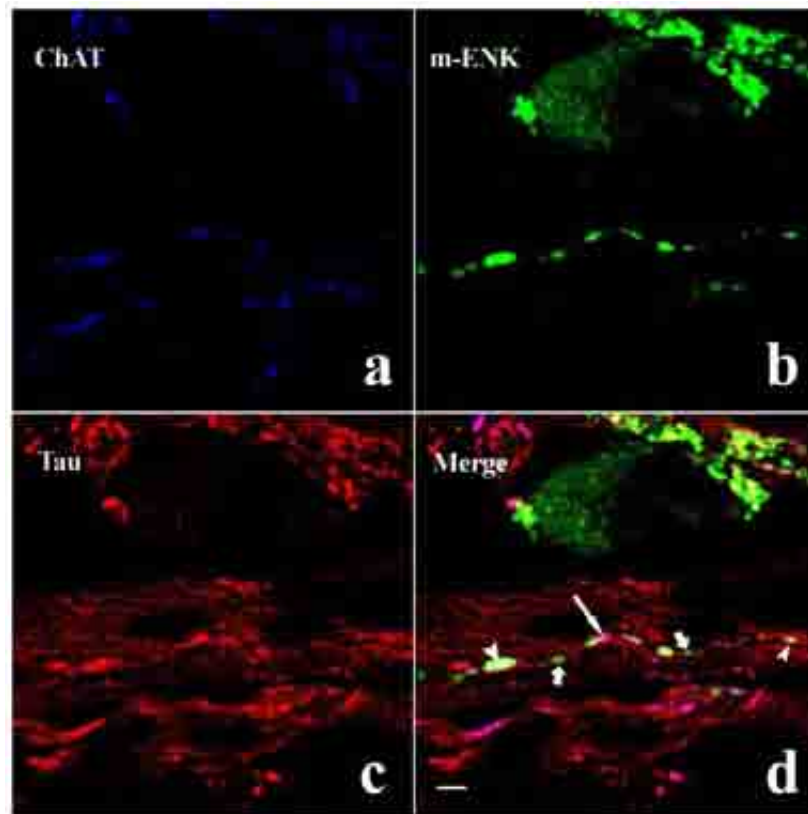


Figura 15. Imágenes capturadas por microscopia confocal de una serie de 12 cortes ópticos de 0.25 μm en la profundidad del eje Z de un corte longitudinal de GCS de rata. Por inmunomarcaje contra ChAT (azul, **a**), mENK (verde, **b**) y Tau (rojo, **c**) (a-d), se observan fibras varicosas IR casi por completo al marcador axonal Tau (merge, **d**), en particular una de ellas presentó unos cuantos segmentos IR a ChAT (flechas delgadas), otros más y que fueron mayoría a mENK (flechas gruesas) y unos pocos en donde coincidieron ambas moléculas ChAT/mENK (cabezas de flechas). Cabe señalar que en la parte superior de las imágenes se distinguen fibras IR a mENK con poca IR a ChAT, así como también un soma encefalinérgico. Cal. 5 μm .

7. La mayoría de los botones peptidérgicos no expresan proteínas de vesículas sinápticas.

Para caracterizar el patrón vesicular de los botones peptidérgicos, exploramos la inmunoexpresión de dos marcadores de vesículas sinápticas, la Syn (específica para scv) y la synaptotagmina (Syt) (proteína localizada y marcador preferencial en las vesículas de núcleo denso [LDCV]). Encontramos que del total de los botones IR a mENK el $67.1 \pm 5.6\%$ no contienen IR a Syn, pero contrario a lo que esperábamos

(dado el almacenaje de mENK en LDCV), también encontramos una alta proporción de fibras encefalinérgicas que no expresan Syt ($57.7 \pm 4.3\%$) no diferente a la proporción a Syn; $P = 0.7$; (Figura 16).

Debido a estos resultados inesperados, decidimos comprobar la especificidad de Syt para marcar LDCV y para ello exploramos en los botones sinápticos los niveles de co-expresión de Syt/Syn considerando de que si la Syt marca indistintamente LDCV y scv, entonces esperaríamos una alta o total co-existencia de Syt con Syn. Sin embargo, el $56.2 \pm 4.8\%$ de los botones Syn no expresaban Syt (Figura 17), lo que nos indica que en 43.8% de botones donde la Syn marcó a las scv, la Syt fue negativo, sugiriendo especificidad de este marcador para las LDCV. Encontramos además que el $34.0 \pm 5.3\%$ de los botones positivos a Syt no eran IR a Syn, por lo que probablemente esta población de botones sólo contienen LDCV.

Con base en estos resultados consideramos necesario explorar si los botones peptidérgicos no colinérgicos son los que mayoritariamente no contenían proteínas de scv. Para ello hicimos un triple inmunomarcaje para detectar mENK, VAcHT y Syn.

Encontramos que de las fibras y botones encefalinérgicos no colinérgicos, sólo $15.5 \pm 1.9\%$ mostraron IR a Syn proporción significativamente menor que el del $40.0 \pm 3.3\%$ que mostraron todas las fibras y botones encefalinérgicos ($P = 0.001$; Figura 18). Esto indica que el 84.5% de las fibras encefalinérgicas no colinérgicas no expresaron Syn comparado con 60.0% de todas las fibras positivas a mENK. Así que las fibras y botones axónicos que no expresan VAcHT, muy probablemente tampoco expresan algún otro marcador sináptico y por tanto no contienen scv.

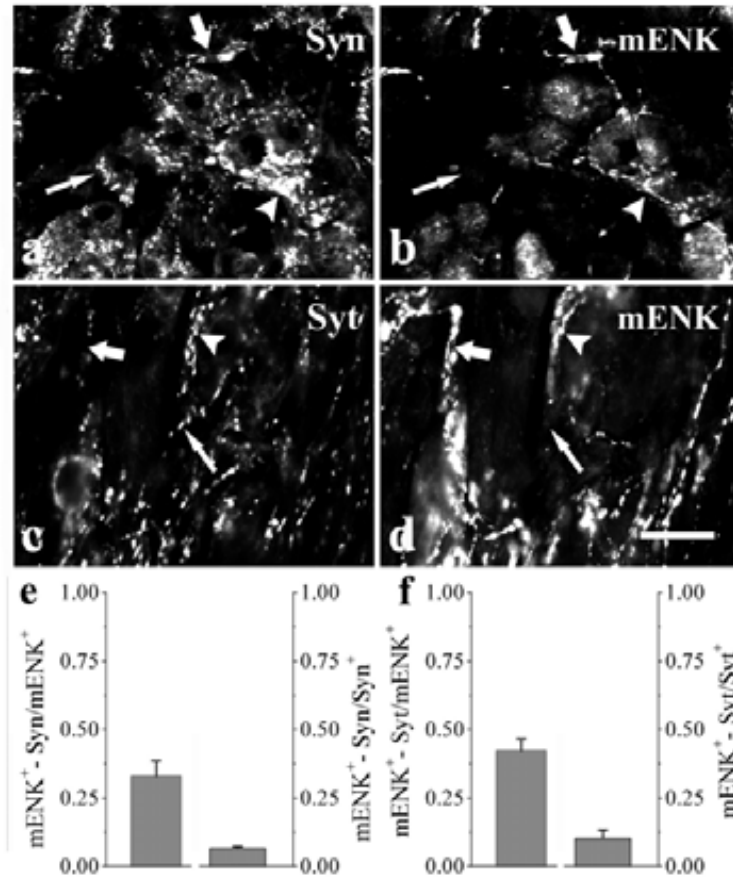


Figura 16. Imágenes de doble inmunofluorescencia para mENK, Syn o Syt, en cortes de ganglio. Una cantidad considerable de botones no expresan proteínas vesiculares. En la primer pareja de imágenes (**a**, **b**), se observan fibras y botones IR al péptido y no a Syn (flechas gruesas dentro de los círculos punteados), en la pareja **c** y **d**, están señaladas también las fibra y botones que tampoco coinciden con la Syt (flechas gruesas dentro de los círculos punteados). En ambos casos se encontraron botones IR a Syn o a Syt pero que no lo eran a mENK (flechas delgadas), así como también algunos botones en los cuales coinciden ambos marcadores analizados (cabezas de flechas). Cal 5 μ m. Las gráficas **e** y **f** muestran la razón de la IR de los marcadores estudiados. Nuevamente en los ejes de la izquierda se muestra la razón entre las fibras y botones que co-expresan mENK con Syn o Syt sobre los que expresan solo mENK. Mientras que a la derecha la razón entre la co-existencia (Syn o Syt/mENK) y la expresión de Syn o Syt. En **f** observamos que de los botones IR a mENK, 32% también lo fueron a Syn. En **g** de los botones IR a mENK, 42% fueron positivos a Syt. Tomado de Sámano et al, 2009 (Neuroscience 163(1) 29:180-189).

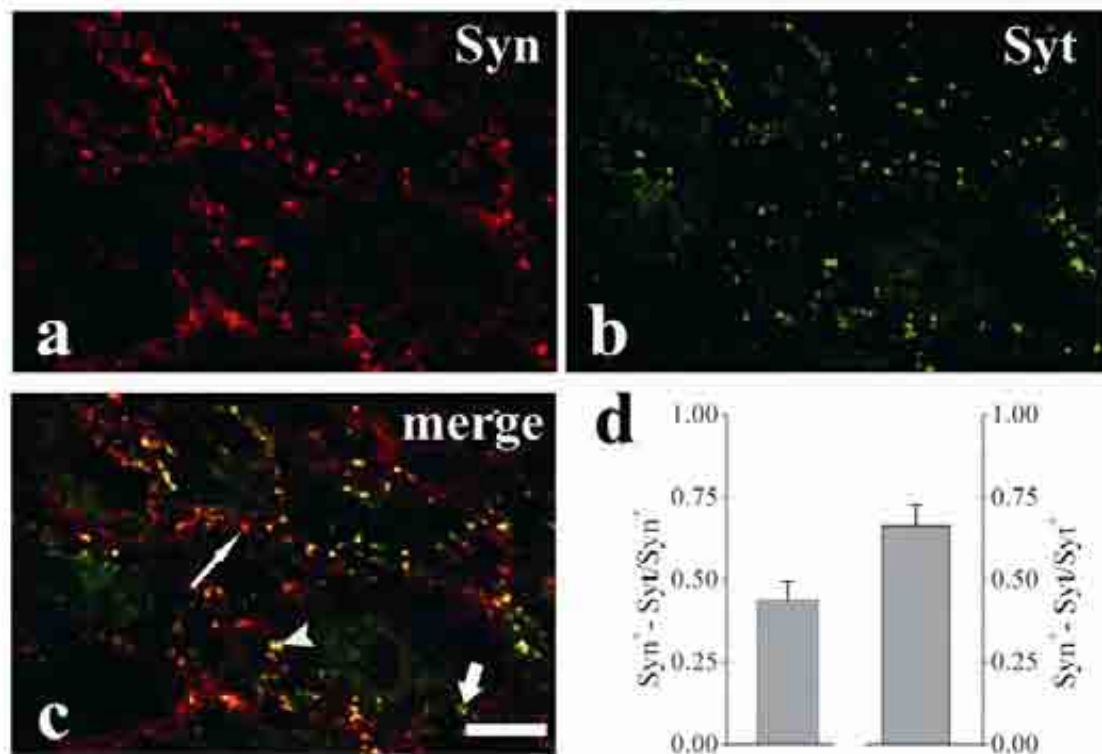


Figura 17. Doble inmunomarcaje contra las proteínas synaptofisina y synaptotagmina. Más de la mitad de los botones IR a Syt no contienen Syn. La doble inmunohistoquímica muestra Syn (a), Syt (b) y la sobreposición de ambos canales (c). En c se aprecian los botones axónicos IR a Syt que no contienen Syn (punteado rojo, flechas delgadas) y los botones que tienen Syn pero no Syt (punteado verde, flechas gruesas) y otros más en los que coinciden ambas marcas (punteado amarillo, cabezas de flechas); cal 5µm. En la parte inferior derecha se presenta la gráfica (d) en la cual se indica la razón de las fibras que co-expresan Syn y Syt/ fibras totales positivas a Syn (eje izquierdo) o Syt (eje derecho); indicando que el 56.2% de las fibras IR a Syn no expresan Syt, mientras que el 34.0% de fibras IR a Syt no expresan Syn. Tomado de Sámano et al, 2009 (Neuroscience 163(1) 29:180-189).

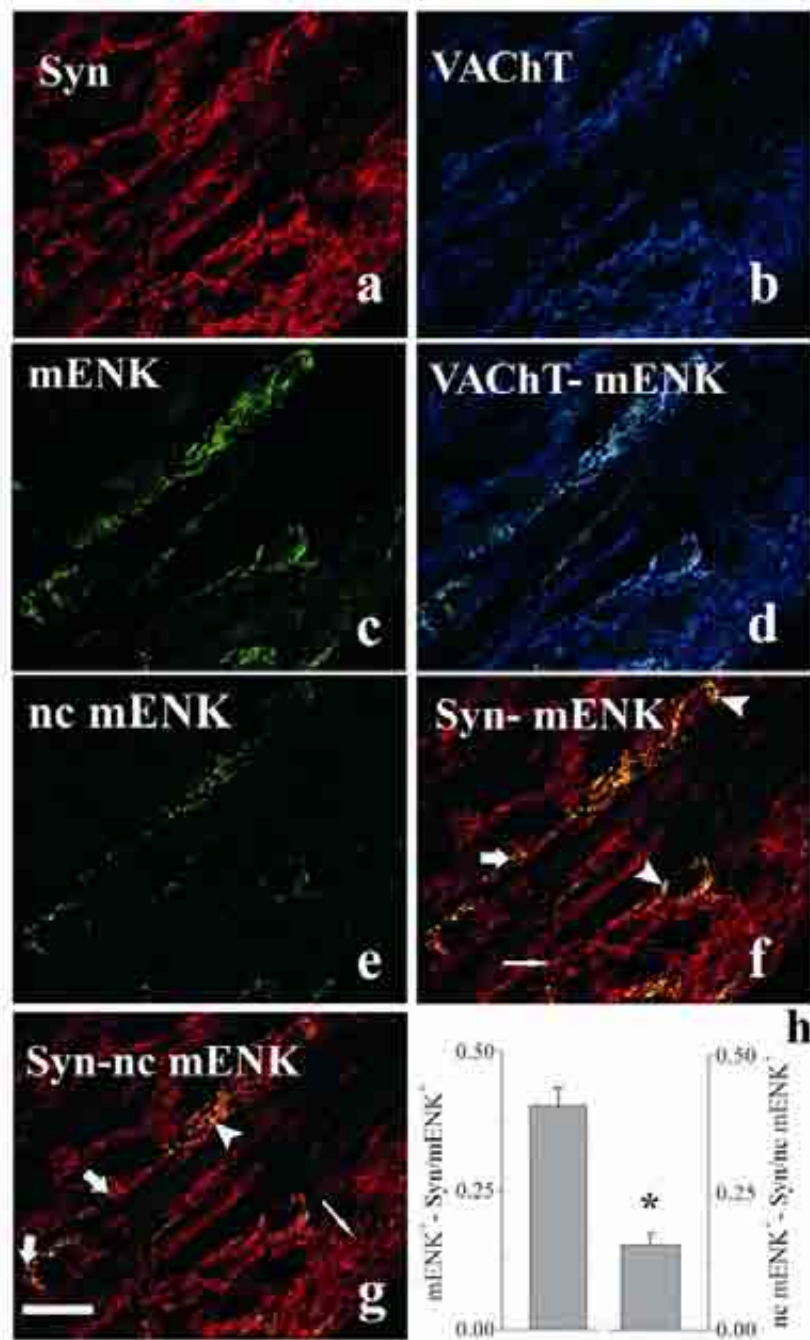


Figura 18. Triple inmunomarcaje para mENK, VAcHT y Syn. La mayoría de los botones encefalinérgicos negativos a VAcHT no expresan a la proteína de vesículas sinápticas, Syn. Se muestran micrografías de una región de ganglio simpático IR a Syn (a), VAcHT (b), mENK (c) y la sobreposición de VAcHT/mENK (d). La población de botones encefalinérgicos no colinérgicos (nc-mENK) (e) se generó por la sustracción de los botones que expresan VAcHT y mENK (botones color cyan en la imagen d) y la población entera de botones mENK (c). En las imágenes de co-localización de Syn-mENK (f) y Syn-nc-mENK (g), muestran los botones IR a mENK que co-expresan (zonas amarillas, cabezas de flechas) o no Syn (zonas verdes, cabezas de flechas), botones IR a Syn que no expresan mENK o nc-mENK (zonas rojas, flechas delgadas); Cal. 10 μ m. La gráfica en h indica la razón de las fibras que co-expresan Syn y mENK/botones totales positivas a mENK (eje izquierdo) y la razón de las fibras nc-mENK que co-expresan Syn/botones totales nc-mENK (eje derecho). La proporción de las fibras y botones axónicos negativo a VAcHT que expresaron syn (15.5%) fue significativamente menor a la proporción del total de los botones positivos a mENK (40.0%; $P = 0.001$). Tomado de Sámano et al, 2009 (Neuroscience 163(1) 29:180-189).

8. Distribución regional de las co-existencias de ChAT, VAcHt, mENK y Syn y dentro del ganglio simpático.

Con el propósito de determinar si los blancos de GCS influyen sobre el patrón regional de segregación, decidimos explorar este patrón en las regiones ganglionares relacionadas con las aferencias del ganglio descritas en la metodología.

La co-existencia del péptido mENK con VAcHt casi no varió a lo largo del ganglio (Figura 19a). Sin embargo, sí encontramos reducciones en las co-existencias de las fibras IR a mENK con ChAT y viceversa (ChAT-mENK).

En las fibras que co-expresaron mENK y ChAT, encontramos reducción de las co-existencias en los extremos del ganglio, en la región caudal con respecto a la rostral, ($3.7 \pm 0.6\%$ vs $6.8 \pm 1.4\%$ $n=6$; $*P = 0.03$ y 0.04 ; respectivamente). También observamos variaciones de co-existencias en las fibras colinérgicas que co-expresaron mENK; en la región caudo-medial con respecto a la rostral ($55.9 \pm 4.6\%$ vs $42.5 \pm 3.1\%$, $n=6$ $*P = <0.05$ respectivamente). Tal reducción en las co-existencias, pudiera deberse a que el número de fibras IR a ChAT se reducen en las regiones rostral y caudo-medial (Figura 19b).

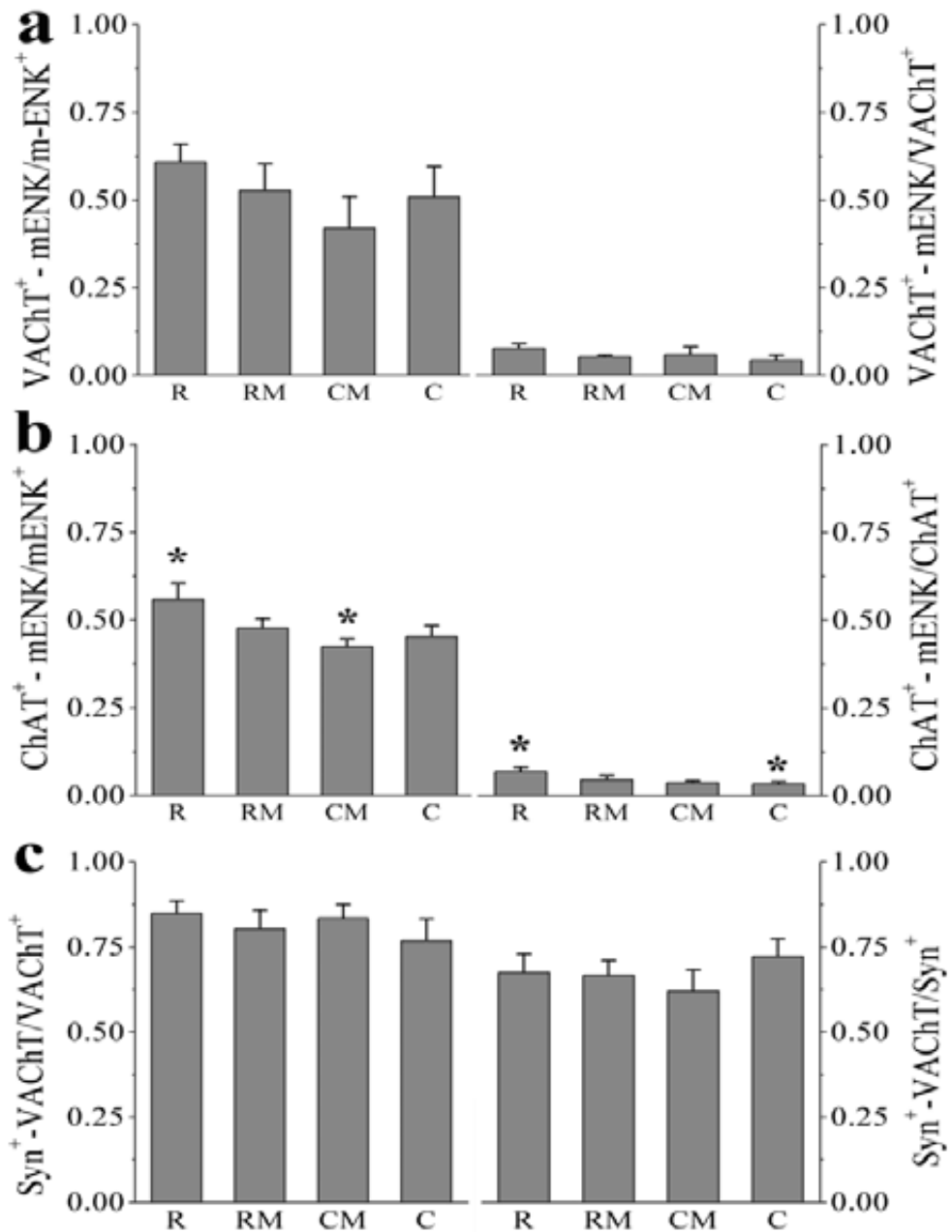


Figura 19. Distribución topográfica de las co-existencias relativas entre los diferentes transmisores, mENK/VAcHT (a), mENK/ChAT (b) y Syn/VAcHT (c) en las 4 regiones ganglionares, rostral (R), rostral-medial (RM), caudal-medial (CM) y caudal (C). La región caudo-medial presentó menos co-existencia de mENK/ChAT (*, $P < 0.05$). Al igual que en el resto de las gráficas, las co-existencias se expresaron como la razón de la fibras que co-expresan o mENK (a) y VAcHT/fibras totales que expresan solo mENK (eje izquierdo) o VAcHT (eje derecho), (b) mENK y ChAT/fibras totales que expresan mENK (eje izquierdo) o ChAT (eje derecho) y finalmente (c) VAcHT y Syn/ fibras totales que expresan VAcHT (eje izquierdo) o Syn (eje derecho). Tomado de Sámano et al, 2009 (Neuroscience 163(1) 29:180-189).

DISCUSION

Este es el primer trabajo en el cual se investiga de manera conjunta en los somas, fibras nerviosas y terminales axónicas de las neuronas preganglionares simpáticas (NPS) la localización, posible co-expresión o segregación de varios péptidos co-transmisores y los marcadores colinérgicos ChAT y VACHT. Nuestros resultados muestran la presencia de ChAT y VACHT y los péptidos NT, mENK, SOM, CGRP y VIP en las NPS y encontramos que los péptidos siempre co-localizan con ChAT o VACHT en los cuerpos celulares, mientras que a nivel de sus terminales axónicas aproximadamente el 40% de las fibras peptidérgicas no co-expresan ChAT o VACHT. Lo anterior sugiere que las NPS tienen la capacidad de segregar sus mediadores a diferentes sinapsis, dando lugar a la presencia de fibras y botones axónicos peptidérgicos no colinérgicos. En los axones preganglionares localizados dentro del TTS, encontramos que ChAT y los péptidos se transportan secuencialmente, dando lugar a una escasa co-localización en los axones, lo cual confirmamos interrumpiendo el transporte axónico al ligar el TTS ya que solo así logramos un incremento en la co-localización de ChAT y NT. Al analizar por microscopia confocal en el GE de gato una fibra preganglionar varicosa y en el GCS de rata también otra fibra preganglionar varicosa pero marcada con Tau, observamos en ambos casos que a lo largo de las fibras habían varicosidades o botones axónicos con diferentes IR, unas a ChAT, otras solo a los péptidos explorados (NT en el GE o mENK en el GCS) y otras pocas en donde coincidían ChAT/NT o ChAT/mENK.

Encontramos una alta proporción de fibras y botones positivos a mENK que no expresaron proteínas de vesículas sinápticas, tales como Syn (para scv) o Syt (para LDCV) que sugiere que dicha subpoblación de botones encefalinérgicos pudiera no

tener un patrón vesicular como el del resto de las fibras y botones axónicos preganglionares y que precisamente el subgrupo de las fibras encefalinérgicas no colinérgicas son las que mayoritariamente no expresan Syn.

Los resultados de co-existencia en los somas de las NPS, concuerdan con los de co-localización de mENK con ChAT en los somas de estas neuronas (Kondo et al., 1985; Colombo-Benkmann et al., 1995), así como también la localización independiente de transmisores en las fibras y botones axónicos que ha sido descrito en ganglios simpáticos de diferentes especies (Lindh et al., 1986; Morales et al., 1995; Jiménez et al., 2002; Chanthaphavong et al., 2003). Cabe señalar que no encontramos diferencia en la proporción de las fibras y botones positivos a VACHT o ChAT, lo que nos demuestra que el uso de ChAT y VACHT es válido y muy semejante, coincidiendo con nuestros resultados reportados previamente en los ganglios simpáticos del gato (Sámano et al., 2006).

El hecho de que existan fibras peptidérgicas no colinérgicas, pudiera también deberse al menos 4 posibilidades: **1)** las fibras peptidérgicas no colinérgicas pueden corresponder a fibras de neuronas sensoriales o interneuronas intraganglionares, o bien a proyecciones provenientes del nervio vago. Sin embargo, esta posibilidad la descartamos debido a que la axotomía del nervio preganglionar simpático remueve el 93% de las fibras peptidérgicas. **2)** Otra posibilidad es que esas fibras sólo peptidérgicas sean proyecciones de NPS no colinérgicas, pero esta opción también se descarta debido a que los somas preganglionares peptidérgicos prácticamente siempre co-expresaron ChAT o VACHT; **3)** que la marca del péptido mENK sí se encuentre dentro de un botón colinérgico, pero lejos de la marca colinérgica, y debido a que VACHT y ChAT están

asociadas con las scv y la mENK con las LDCV, entonces tal y como lo sugirió Chanthaphavong y col. sería posible que no se observe co-localización completa de ambos marcadores y se distinga como localización subcelular diferencial (Chanthaphavong et al., 2003). Esta posibilidad explicaría la localización independiente de la mENK y VACHT si se localizaran a una distancia menor de 1-2 μ m (tamaño de un botón sináptico o varicosidad dentro del ganglio simpático), sin embargo, no explicaría las localizaciones separadas de los péptidos con ChAT o VACHT de alrededor de 2 μ m que frecuentemente encontramos; 4) es probable que las fibras y botones peptidérgicos sí contengan ChAT o VACHT, pero a concentraciones muy bajas como para ser inmunodetectadas, en este caso pudiera tratarse de una segregación en la cantidad de moléculas y no tanto de presencia y/o ausencia.

De acuerdo al descarte de las posibilidades arriba mencionadas la más probable es que las NPS puedan sintetizar a su transmisor clásico y varios neuropéptidos y segregarlos o separarlos en diferentes terminales axónicas. Existen varios reportes en invertebrados y mamíferos, en los cuales también se ha sugerido que las neuronas pueden segregar neurotransmisores a diferentes sinapsis. Así, en el molusco *Aplysia californica*, las células del saco procesan a partir de la hormona (egg-laying prohormone), dos péptidos los cuales se almacenan en diferentes vesículas sinápticas, las cuales a su vez se segregan a diferentes procesos celulares (Fisher et al, 1988; Sossin et al, 1990); en la misma línea de investigación, en el sistema estomatogástrico del cangrejo *Cancer borealis*, Blitz y Nusbaum reportaron que las neuronas sintetizan y liberan GABA y el péptido proctolina a diferentes procesos neuronales los cuales a su vez inervan a diferentes blancos (Blitz and Nusbaum, 1999). En mamíferos, en 1991 Hattori y col. encontraron que las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales de rata

tienen proyecciones axónicas con dos transmisores diferentes (Hattori et al, 1991). Datos similares fueron publicados en neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA), en los cuales sugieren que tanto *in vivo* como *in vitro* segregan dopamina y glutamato a diferentes varicosidades que inervan a neuronas del núcleo accumbens (Sulzer et al, 1998; Sulzer and Rayport 2000). Algunos años después, Landry y col. demostraron mediante inmunocitoquímica, ultraestructura e hibridación *in situ*, que las neuronas magnocelulares del hipotálamo de la rata, sintetizan y envían a los péptidos galanina y vasopresina a diferentes dendritas y axones (Landry et al, 2003). Nishimaru y col. demostraron mediante registros electrofisiológicos, que las motoneuronas espinales colinérgicas de la rata liberan en las células de Renshaw (sinapsis centrales) ACh y Glu, mientras que en las sinapsis que establecen con las uniones neuromusculares liberan solo Ach, sugiriendo que las motoneuronas espinales segregan a los neurotransmisores a diferentes terminales (Herzog et al, 2004; Nishimaru et al, 2005). Recientemente, se reportó por hibridación *in situ*, RT-PCR y microscopía electrónica que las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas expresan varicosidades con diferente contenido, algunas almacenan al transportador vesicular para el glutamato (VGLUT2) y otros la enzima tirosina hidroxilasa (TH) (Dal Bo et al, 2008; Descarries et al 2008).

Las evidencias antes mencionadas apoyan la hipótesis de que en las NPS ocurre el mecanismo de segregación de transmisores a nivel de sus terminales axónicas. El hecho de que no hayamos encontrado tanto en gato como en rata, marcadores colinérgicos en casi la mitad de los botones encefalinérgicos, levanta la posibilidad de que otro transmisor clásico pudiera estar presente en estos botones. Así, se ha reportado la presencia de GABA (Kása et al, 1988; Wolff et al, 1989; Ito et al, 2007), glutamato

(Morrison et al, 1989; Ito et al, 2005), dopamina (Heym et al, 1981) o serotonina (Karhula et al., 1995) en los ganglios simpáticos; sin embargo, en el ganglio cervical superior se ha reportado, que las fibras y botones IR a esos transmisores clásicos también co-expresan VAcHt (Ito et al, 2005, 2007), o no co-expresan el péptido mENK (Párducz et al, 1992; Dobó et al, 1993); pero aún queda la incógnita de si algún otro transmisor clásico pueda expresarse en esas fibras encefalinérgicas; aunque la falta de marcadores de vesículas sinápticas en dichos botones, hace menos probable la existencia de otros transmisores clásicos.

Por otro lado, esperábamos que el marcaje de la proteína Syt coincidiera con las fibras y botones peptidérgicos ya que dicha proteína se encuentra preferencialmente en las vesículas de núcleo denso (LDCV) donde se almacenan los neuropéptidos (Bean et al, 1994; Boarder, 1989; Merighi, 2002; Südhof, 2004). Contrariamente, encontramos que cerca del 60% de fibras y botones encefalinérgicos no expresan Syt. La carencia de marcadores tanto de scv como de LDCV en botones encefalinérgicos abriría la posibilidad de que estas varicosidades tengan otro tipo de vesículas como las pequeñas de núcleo denso involucradas en la sinaptogénesis (Zhai et al., 2001; Sorra et al., 2006), las cuales almacenarían a la mENK y no expresarían los marcadores Syn ni Syt. Al respecto, de botones que no expresan marcadores de vesículas sinápticas se han publicado algunos datos en el ganglio celíaco, donde fibras y botones peptidérgicos pueden o no expresar ChAT, VAcHt o proteínas vesiculares (Syn, Syt, synapsina, SNPA-25) (Gibbins et al, 2003; Morris et al, 2005; Gibbins and Morris, 2006). Para esclarecer estas observaciones será necesario investigar la ultraestructura de los botones peptidérgicos. Con respecto al papel de la mENK en la transmisión ganglionar podríamos considerar que en estas fibras la mENK pudiera fungir como transmisor

clásico o bien participar en las sinapsis como péptido neuromodulador, aunque se almacene y libere independientemente en diferentes botones; estos botones inervarían o convergerían sobre los mismos blancos que los botones con Ach. Este tipo de convergencia diferencial ha sido reportada (Gibbins, 1992; Murphy et al, 1998; Jiménez et al., 2002).

De acuerdo a la distribución homogénea encontrada de las neuronas ganglionares (Bowers and Zigmond 1979), la inesperada distribución heterogénea rostro-caudal de las fibras y botones preganglionares IR a ChAT, VACHT y mENK puede estar relacionada con la heterogeneidad bioquímica y funcional de las neuronas ganglionares (Furness et al., 1989; Wolf et al, 1989; Li and Horn, 2006). Las co-existencias se distribuyeron homogéneamente, con excepción de mENK-ChAT y ChAT-mENK que fue menor en la región caudo-medial con respecto a la rostral. Esta diferencia sugiere que las neuronas de esa región pudieran requerir mayor inervación de las fibras encefalinérgicas sin ChAT.

Concientes de las limitaciones que presenta un estudio con tejido previamente fijado, donde se revela sólo una imagen instantánea de los contenidos de mediadores y, dado el conocido potencial plástico tanto *in vivo* como *in vitro* del fenotipo de las neuronas simpáticas (Potter et al., 1986; Yang et al., 2002; Slonimsky et al, 2003), se puede considerar que la presencia o ausencia de ChAT, VACHT o los péptidos pudiera cambiar constantemente. En este caso, la segregación de transmisores en las NPS pudiera ser un fenómeno plástico, temporal y depender de los requerimientos de las células ganglionares, o de diversos factores fisiológicos a los cuales las NPS pueden responder *in situ*, tales como el estrés, enfermedades autonómicas o la exposición

temporal de neurotrofinas circulantes en el organismo; sin embargo, aún no se conocen las señales o factores que probablemente inducen a la segregación o co-existencia de transmisores.

Estos hallazgos de segregación de mediadores tienen una implicación importante en el campo de la biología celular ya que se contraponen al patrón morfológico de almacenaje de transmisores y co-transmisores que se acepta actualmente. Nuestra propuesta es que la co-transmisión presináptica y neuromodulación se podría ejercer por la liberación conjunta del transmisor clásico y los co-transmisores almacenados en botones separados, cuyas acciones convergerían pre y/o postsinápticamente y no necesariamente por la liberación conjunta de transmisores provenientes de los mismos botones y terminales axónicas; tal y como se esquematiza en la figura 20.

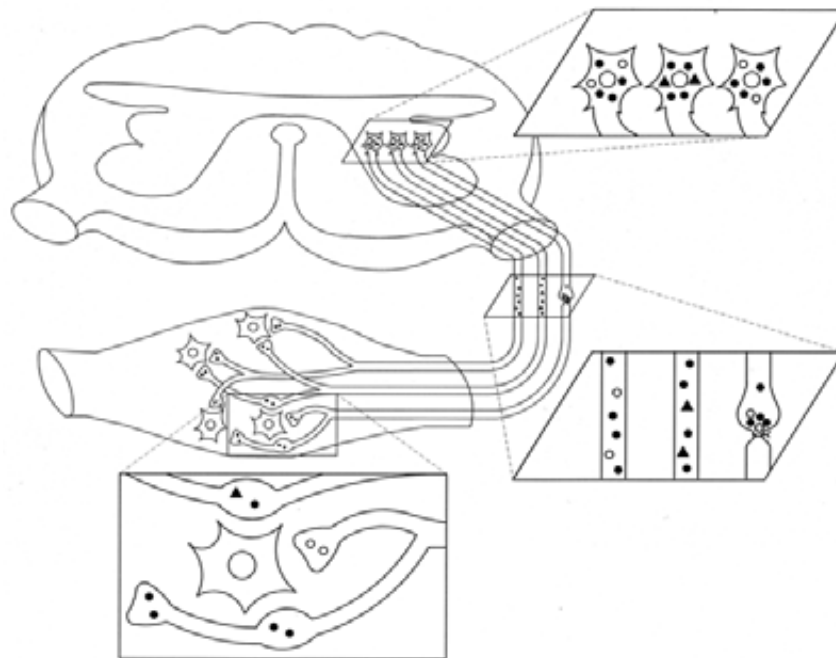


Figura 20. Representación esquemática del modelo propuesto de segregación de mediadores en las NPS. Se representa la vía de la sinapsis ganglionar autonómica, entre las NPS localizadas en el asta intermediolateral de la médula espinal y las neuronas ganglionares del ganglio simpático. Los somas de las neuronas amplificadas (recuadro superior derecho) ejemplifican la co-existencia de ChAT o VAChT (círculos negros) con algún péptido (triángulos y círculos vacíos), los transmisores son transportados secuencialmente por transporte axónico a través de los axones preganglionares del TTS (amplificación en el recuadro inferior), hacia el ganglio simpático donde se segregan o separan los transmisores a diferentes fibras y botones terminales. La interrupción del transporte axonal produce la acumulación de los transmisores en los axones preganglionares, lo que genera un incremento en la co-existencia de los transmisores en los axones del TTS (amplificación en el recuadro inferior). Tomado de Sámano et al, *Synapse* 60:295-306, 2006.

CONCLUSIONES

1. De los transmisores explorados en la médula espinal de las NPS, detectamos a la ACh a través de la IR a la enzima ChAT y del transportador vesicular VAcHT, así como a los péptidos NT, mENK, SOM, CGRP y VIP. Encontramos que en las somas de las NPS, los péptidos se co-expresaron con ChAT o VAcHT, no detectamos somas sólo peptidérgicas, lo que nos indicó que todas las NPS peptidérgicas fueron colinérgicas.
2. Los transmisores explorados en el presente trabajo los detectamos en diferentes fibras y botones axónicos dentro de los ganglios simpáticos del gato y la rata, con una alta proporción de fibras peptidérgicas que no expresaron marcadores colinérgicos.
3. Confirmamos la discrepancia entre la prácticamente total co-expresión de péptidos y marcadores colinérgicos en somas y la localización independiente parcial de estas moléculas en diferentes botones preganglionares, lo que sugiere la segregación de transmisores y co-transmisores en las NPS.
4. En los axones dentro del TTS, casi no observamos co-localización de los péptidos con ChAT ya que los transmisores se transportan de manera secuencial a lo largo de las fibras axónicas, lo cual corroboramos al interrumpir el transporte axónico mediante la ligadura del TTS.
5. Encontramos una importante proporción (>50%) de fibras peptidérgicas que no expresan los marcadores de vesículas sinápticas. Syn (scv) y Syt (LDCV).

6. De la proporción de botones encefalinérgicos que no contienen inmunorreactividad a los marcadores de proteínas vesiculares, Syn (scv) y Syt (LDCV), los negativos a VAcHT son los que presentaron menor co-expresión con Syn. Estos resultados plantean la posibilidad de que parte de los botones encefalinérgicos almacenen a la mENK en diferente tipo de vesículas sinápticas.

7. Consideramos que esta segregación o distribución diferencial de mediadores pudiera ser transitoria y obedecer a cambios funcionales o demandas de las sinapsis, de tal forma que cada terminal presináptica almacenaría y liberaría al mediador que las funciones o sinapsis establezcan y/o demanden.

8. En perspectiva, la segregación debería ser considerada en diferentes neuronas y especies como un fenómeno común y susceptible a cualquier cambio, ya sea por requerimientos de las neuronas o factores ambientales. Aunque se han descrito en diferentes sistemas que las neuronas pueden segregar transmisores, aún se desconocen los mecanismos intracelulares o factores ambientales que pudieran desencadenar o modificar la separación, segregación o localización diferencial de los neurotransmisores a diferentes procesos celulares.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson CR, Keast JR and McLachlan EM. **Spinal Autonomic Preganglionic Neurons: the visceral efferent system of the spinal cord.** In: Spinal Cord. Text and Atlas. Watson C, Paxinos G and Kayalioglu G (eds). Elsevier and Chistopher and Dana Reeve foundation, First edition, 2009.
- Bachoo M, Ciriello J, Polosa C. **Effect of preganglionic stimulation on neuropeptide-like immunoreactivity in the stellate ganglion of the cat.** Brain Res. 1987 Jan 6;400(2):377-82.
- Barañano DE, Ferris CD, Snyder SH. **Atypical neural messengers.** Trends Neurosci. 2001 Feb;24(2):99-106.
- Bean AJ, Zhang X, Hökfelt T. **Peptide secretion: what do we know?** FASEB J. 1994 Jun;8(9):630-8.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. **Neuroscience: Exploring the Brain.** 1996. Williams & Wilkins. USA.
- Bergersen LA, Ruiz JG, Mjaalie DM. Kullmann and V. Gundersen. **GABA and GABAA receptors at hippocampal mossy fibre synapses.** Eur. Journal Neurosci. 2003;18:931-941.
- Blitz DM, Nusbaum MP. **Distinct functions for cotransmitters mediating motor pattern selection.** J Neurosci. 1999 Aug 15;19(16):6774-83.
- Boarder MR. **Presynaptic Aspects of Cotransmission: Relationship Between Vesicles and Neurotransmitters.** J Neurochem. 1989;53:1-11.
- Bowers CW, Zigmond RE. **Localization of neurons in the rat superior cervical ganglion that project into different postganglionic trunks.** J Comp Neurol. 1979;185:381-391.
- Brose N, Petrenko AG, Südhof TC, Jahn R. **Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface.** Science. 1992 May 15;256(5059):1021-5.
- Burnstock G. **Purinergic nerves.** Pharmacol Rev. 1972 Sep;24(3):509-81.
- Burnstock G. **Do some nerve cells release more than one transmitter?** Neuroscience. 1976 Aug;1(4):239-48.
- Burnstock G. **Cotransmission.** Curr Opin Pharmacol. 2004 Feb;4(1):47-52.

- Burnstock G (a). **Historical review: ATP as a neurotransmitter.** Trends Pharmacol Sci. 2006 Mar;27(3):166-76. Epub 2006 Feb 17.
- Burnstock G. (b). **Purinergic signalling.** Br J Pharmacol. 2006 Jan;147 Suppl 1:S172-81.
- Burnstock G. **Autonomic neurotransmission: 60 years since sir Henry Dale.** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2009;49:1-30.
- Burré J, Volkandt W. **The synaptic vesicle proteome.** J Neurochem. 2007 Jun;101(6):1448-62.
- Chanthaphavong RS, Murphy SM, Anderson CR. **Chemical coding of sympathetic neurons controlling the tarsal muscle of the rat.** Auton Neurosci: Basic Clin 2003;105:77-89.
- Chun JY, Korner J, Kreiner T, Scheller RH, Axel R. The function and differential sorting of a family of aplysia prohormone processing enzymes. Neuron. 1994; 12:831-844.
- Colombo-Benkmann M, Heym C, Schemann M. **Preganglionic sympathetic neurons, innervating the guinea pig adrenal medulla, immunohistochemically contain choline acetyltransferase and also leu-enkephalin.** Neurosci Lett. 1995;190:155-158.
- Dal Bo G, Bérubé-Carrière N, Mendez JA, Leo D, Riad M, Descarries L, Lévesque D, Trudeau LE. **Enhanced glutamatergic phenotype of mesencephalic dopamine neurons after neonatal 6-hydroxydopamine lesion.** Neuroscience. 2008;156:59-70.
- Dembowski K, Czachurski J, and Seller H. **Morphology of sympathetic preganglionic neurons in the thoracic spinal cord of the cat: and intracellular horseradish peroxidase study.** The J. Comp. Neurol. 1985;288:453-465.
- Descarries L, Bérubé-Carrière N, Riad M, Bo GD, Mendez JA, Trudeau LE. **Glutamate in dopamine neurons: synaptic versus diffuse transmission.** Brain Res Rev. 2008;58:290-302.
- Dobó E, Joó F, Wolff JR. **Distinct subsets of neuropeptide Y-negative principal neurons receive basket-like innervation from enkephalinergic and gabaergic axons in the superior cervical ganglion of adult rats.**

Neuroscience. 1993;57:833-844.

- Eccles JC. **Chemical transmission and Dale's principle.** Prog. Brain Res 1986;68:3-13.
- Elfvin LG, Lindh B, Hökfelt T. **The chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia.** Annu. Rev. Neurosci. 1993;16:471-507.
- Fisher JM, Sossin W, Newcomb R, Scheller RH. **Multiple neuropeptides derived from a common precursor are differentially packaged and transported.** Cell. 1988;54:813-822.
- Furness JB, Morris JL, Gibbins IL, Costa M. **Chemical coding of neurons and plurichemical transmission.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1989;29:289-306.
- Gibbins IL. **Vasoconstrictor, vasodilator and pilomotor pathways in sympathetic ganglia of guinea-pigs.** Neuroscience. 1992;47:657-672.
- Gibbins IL, Jobling P, Teo EH, Matthew SE, Morris JL. **Heterogeneous expression of SNAP-25 and synaptic vesicle proteins by central and peripheral inputs to sympathetic neurons.** J Comp Neurol. 2003;459:25-43.
- Gibbins IL, Morris JL. **Structure of peripheral synapses: autonomic ganglia.** Cell Tissue Res. 2006 Nov;326(2):205-20. 2006
- Gutiérrez R. **The dual glutamatergic–GABAergic phenotype of hippocampal granule cells.** Trends Neurosci. 2005 Jun;28(6):297-303.
- Guyton AC. and Hall JE. **Tratado de fisiología médica.** Interamericana, McGraw-Hill. 9ª ed. México, 1998.
- Hanley MR, Cottrell GA. **Acetylcholine activity in an identified 5-hydroxytryptamine containing neuron.** J Pharm Pharmacol. 1974 Dec;26(12):980.
- Hattori T, Takada M, Moriizumi T, Van Der Kooy D. **Single dopaminergic nigrostriatal neurons form two chemically distinct synaptic types: possible transmitter segregation within neurons.** J Comp Neurol. 1991;309:391-401.
- Herzog E, Landry M, Buhler E, Bouali-Benazzouz R, Legay C, Henderson CE, Nagy F, Dreyfus P, Giros B, El Mestikawy S. **Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in cholinergic spinal motoneurons.** Eur J Neurosci. 2004 Oct;20(7):1752-60.
- Heym C, König R, Schröder H, Gerold N. **Immunofluorescent and biochemical studies on dopamine-beta-hydroxylase and catecholamines in**

- SIF cells of the superior cervical ganglion.** *Acta Histochem Suppl.* 1981; 24:123-129.
- Hökfelt T, Elfvin LG, Elde R, Schultzberg M, Goldstein M, Luft R. **Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Aug;74(8):3587-3591.
 - Hökfelt T, O, Johansson, A, Ljungdahl, JM, Lundberg and M, Schultzberg. **Peptidergic neurones.** *Nature.* 1980;284(10):515-521.
 - Hökfelt T, Millhorn K, Serogy Y, Tsuruo S, Ceccatelli B, Lindh B, Meister T, Melander M, Schalling T, Bartfai T and L. Terenius. **Coexistence of peptides with classical neurotransmitters.** *Experientia.* 1987;43:768-780.
 - Hökfelt T, VR. Holets, W. Staines, B. Meister, T. Melander, M. Schalling, M. Scultzberg, J. Freedman, H. Björklund, L. Olson, B. Lindh, LG, Elfvin, JM, Lundberg, JA, Lindgren, B, Samuelsson, B, Pernow, L, Terenius, C, Post, B, Everitt and M, Goldstein. **Coexistence of neuronal messengers--an overview.** *Prog. Brain Res.* 1986;68:33-70.
 - Hook V, Funkelstein L, Lu D, Bark S, Wegrzyn J, Hwang SR. **Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:393-423.
 - Ito T, Iino S, Nojyo Y (a). **A part of cholinergic fibers in mouse superior cervical ganglia contain GABA or glutamate.** *Brain Res.* 2005;1046:234-238.
 - Ito T, Hioki H, Nakamura K, Tanaka Y, Nakade H, Kaneko T, Iino S, Nojyo Y (b). **Gamma-aminobutyric acid-containing sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord send their axons to the superior cervical ganglion.** *J Comp Neurol.* 2007;502:113-125.
 - Jiménez B, Mora-Valladares E, Zetina ME, Morales MA. **Occurrence, co-occurrence and topographic distribution of choline acetyltransferase, met-enkephalin and neurotensin in the stellate ganglion of the cat.** *Synapse.* 2002;43:163-174.
 - Jo YH, Schlichter R. **Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons.** *Nat Neurosci.* 1999 Mar;2(3):241-5.
 - Jonas P, J. Bischofberger J, Sandkühler. **Corelease of two fast**

- neurotransmitters at a central synapse.** *Science*. 1998;281:419-424.
- Joyce MP, Rayport S. **Mesoaccumbens dopamine neuron synapses reconstructed in vitro are glutamatergic.** *Neuroscience*. 2000; 99:445-456.
 - Karhula T, Soinila S, Lakomy M, Majewski M, Kaleczyk J, Häppölä O. **5-Hydroxytryptamine-immunoreactive nerve fibers in the rat and porcine prevertebral sympathetic ganglia: effect of precursor loading and relation to catecholaminergic neurons.** *Neurosci Lett*. 1995;194:85-88.
 - Kása P, Joó F, Dobó E, Wenthold RJ, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Wolff JR. **Heterogeneous distribution of GABA-immunoreactive nerve fibers and axon terminals in the superior cervical ganglion of adult rat.** *Neuroscience*. 1988;26:635-644.
 - Kondo H, Kuramoto H, Wainer BH, Yanaihara N. **Evidence for the coexistence of acetylcholine and enkephalin in the sympathetic preganglionic neurons of rats.** *Brain Res*. 1985;335:309-314.
 - Kupfermann I. **Functional studies of cotransmission.** *Physiol Rev*. 1991 Jul;71(3):683-732.
 - Krukoff TL, Ciriello J, Calaresu FR. **Segmental distribution of peptide-like immunoreactivity in cell bodies of the thoracolumbar sympathetic nuclei of the cat.** *The J. Comp. Neurol*. 1985;240:90-102.
 - Krukoff TL. **Coexistence of neuropeptides in sympathetic neurons of the cat.** *Peptides*. 1987;8:109-112.
 - [Lachmund A](#), [Gehrke D](#), [Kriegelstein K](#), [Unsicker K](#). **Trophic factors from chromaffin granules promote survival of peripheral and central nervous system neurons.** [Neuroscience](#). 1994 Sep;62(2):361-70
 - Li WC, Soffe SR, Roberts A. **Glutamate and acetylcholine corelease at developing synapses.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 26;101(43):15488-93.
 - Li C, Horn JP. **Physiological classification of sympathetic neurons in the rat superior cervical ganglion.** *J Neurophysiol*. 2006;95:187-195.
 - Lindh B, Staines W, Hökfelt T, Terenius L, Salvaterra P. **Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea pig autonomic ganglia.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:5316-5320.

- Lundberg JM and Hökfelt T. **Coexistence of peptides and classical neurotransmitters.** TINS. 1983; August. 325-333.
- Lundberg JM, Hökfelt T. **Multiple co-existence of peptides.** Prog Brain Res. 1986;68:241-62.
- Lundberg JM. **Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide.** Pharmacol Rev. 1996. Vol. 48, No. 1. 113-135.
- M. Schultzberg, J. M. Lundberg, T. Hökfelt, L. Terenius, J. Brandt, R. P. Elde and M. Goldstein. **Enkephalin-like immunoreactivity in gland cells and nerve terminals of the adrenal medulla.** Neuroscience. 1978;3:1169-1186.
- M. Schultzberg, T. Hökfelt, L. Terenius, L.G. Elfvín, J. M. Lundberg, J. Brandt, R.P. Elde and M. Goldstein. **Enkephalin immunoreactive nerve fibres and cell bodies in sympathetic ganglia of the guinea-pig and rat.** Neuroscience. 1979;4(2):249-70.
- Matthews G. **Neurotransmitter release.** Annu. Rev. Neurosci. 1996;19:219-33.
- Merighi A. **Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS.** Prog Neurobiol. 2002;66:161-190.
- Morales MA, Holmberg K, Xu Z, Cozzari C, Hartman B, Emson P, Goldstein M, Elfvín L, Hökfelt T. **Localization of choline acetyltransferase in rat peripheral sympathetic neurons and its coexistence with nitric oxide synthase and neuropeptides.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:11819-11823.
- Morris JL, König P, Shimizu T, Jobling P, Gibbins IL. **Most peptide-containing sensory neurons lack proteins for exocytotic release and vesicular transport of glutamate.** J Comp Neurol. 2005 Feb 28;483(1):1-16.
- Morrison SF, Callaway J, Milner TA, Reis DJ. **Glutamate in the spinal sympathetic intermediolateral nucleus: localization by light and electron microscopy.** Brain Res. 1989;503:5-15.
- Murphy SM, Matthew SE, Rodgers HF, Litori DT, Gibbins IL. **Synaptic organization of neuropeptide-containing preganglionic boutons in lumbar sympathetic ganglia of guinea pigs.** J Comp Neurol. 1998;398:551-567.

- Nicholls DG. **Mechanisms of exocytosis, in: Proteins, Transmitters and Synapses.** Oxford, Blackwell Scientific Publications. 1994.
- Nicoll RA, Malenka RC. **A tale of two transmitters.** Science. 1998 Jul 17;281(5375):360-1.
- Nishimaru H, Restrepo CE, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O. **Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:5245-5249.
- Nozdrachev AD, Fateev MM, Jiménez B, Morales MA. Circuits and projections of cat stellate ganglion. Arch Med Res. 2003 Mar-Apr;34(2):106-15.
- Oda Y. **Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system.** Pathol Int. 1999 Nov; 49(11):921-37.
- Párducz A, Dobo E, Joo F, Wolff JR. **Termination pattern and fine structural characteristics of GABA- and [Met]enkephalin-containing nerve fibers and synapses in the superior cervical ganglion of adult rat.** Neuroscience. 1992; 49:963-971.
- Potter DD, Matsumoto SG, Landis SC, Sah DWY, Furshpan EJ. **Transmitter status in cultured sympathetic principal neurons: plasticity, graded expression and diversity. In Coexistence of Neuronal messenger: A new principle in chemical transmission.** Progress in Brain Research. 1986, Vol 6 (Hökfelt T, Fuxe K, Pernow B, eds), pp 103-120 Amsterdam: Elsevier.
- Prado MA, Reis RA, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG. **Regulation of acetylcholine synthesis and storage.** Neurochem Int. 2002 Nov; 41(5):291-9.
- Rafael Gutiérrez, Héctor Romo-Parra, Jasmín Maqueda, Carmen Vivar, Mónica Ramírez, Miguel A. Morales, and Mónica Lamas. **Plasticity of the GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the rat dentate gyrus.** The Journal of Neurosci. July 2, 2003 • 23(13):5594 –5598.
- Salio C, Lossi L, Ferrini F, Merighi A. **Neuropeptides as synaptic transmitters.** Cell Tissue Res. 2006 Nov;326(2):583-98. Epub 2006 Jul 18.
- Sámano C, Zetina ME, Marín MA, Cifuentes F, Morales MA. **Choline acetyltransferase and neuropeptide immunoreactivities are colocalized in somata,**

- but preferentially localized in distinct axon fibers and boutons of cat sympathetic preganglionic neurons.** *Synapse*. 2006;60:295-306.
- **Sámano C, Zetina ME, Cifuentes F, Morales MA. Segregation of Met-Enkephalin from VAcHt and ChAT in Sympathetic Preganglionic Varicosities Mostly Lacking Synaptophysin and Synaptotagmin.** *Neuroscience*, 163(1) 29:180-189.
 - **Sandler R, Smith AD. Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study.** *J Comp Neurol*. 1991 Jan 8;303(2):177-92.
 - **Schultzberg M. Overviews of colocalization of peptides in the peripheral nervous system.** In *Coexistence of neuroactive substances in neurons* (Chan Palay & Palay Eds.) Wiley series in neurobiology. 1984. 225 pp.
 - **Seal RP, Edwards RH. Functional implications of neurotransmitter co-release: glutamate and GABA share the load.** *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Feb;6(1):114-9.
 - **Slonimsky JD, Yang B, Hinterneder JM, Nokes EB, Birren SJ. BDNF and CNTF regulate cholinergic properties of sympathetic neurons through independent mechanisms.** [Mol Cell Neurosci](#). 2003 Aug;23(4):648-60.
 - **Sneddon P & Burnstock G. ATP as a co-transmitter in rat tail artery.** *Eur J Pharmacol*. 1985 Oct 30;106(1):149-52.
 - **Sorra KE, Mishra A, Kirov SA, Harris KM. Dense core vesicles resemble active-zone transport vesicles and are diminished following synaptogenesis in mature hippocampal slices.** *Neuroscience*. 2006;141:2097-2106.
 - **Sossin WS, A. Sweet-Cordero and RH. Scheller. Dale's hypothesis revised: differential neuropeptides derived from a common precursor are targeted to different processes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990;87: 4845-4848.
 - **Strata P, Harvey R. Dale's principle.** [Brain Res Bull](#). 1999 Nov 15-Dec;50(5-6):349-50.
 - **Südhof T.C. The synaptic vesicle cycle.** *Annu Rev Neurosci*. 2004;27:509-47.
 - **Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S. Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro.** *J Neurosci*. 1998;18:4588-45602.

- Sulzer D, Rayport S. **Dale's principle and glutamate corelease from ventral midbrain dopamine neurons.** [Amino Acids](#). 2000;19(1):45-52.
- Tansey EM, Henry. **Dale and the discovery of acetylcholine.** *C R Biol*. 2006 May-Jun;329(5-6):419-25.
- Thomas L, Hartung K, Langosch D, Rehm H, Bamberg E, Franke WW, Betz H. **Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane.** *Science*. 1988 Nov 18;242(4881):1050-3.
- Trudeau LE. **Glutamate co-transmission as an emerging concept in monoamine neuron function.** [J Psychiatry Neurosci](#). 2004 Jul;29(4):296-310.2003;
- Trudeau LE, Gutiérrez R. **On cotransmission & neurotransmitter phenotype plasticity.** [Mol Interv](#). 2007 Jun;7(3):138-46.
- Valenstein ES. **The discovery of chemical neurotransmitters.** *Brain Cogn*. 2002. Jun;49(1):73-95.
- Vilim FS, Cropper EC, Price DA, Kupfermann I, Weiss KR. (a). **Release of peptide cotransmitters in Aplysia: regulation and functional implications.** *J Neurosci*. 1996 Dec 15;16(24):8105-14.
- Vilim FS, Price DA, Lesser W, Kupfermann I, Weiss KR. (b). **Costorage and corelease of modulatory peptide cotransmitters with partially antagonistic actions on the accessory radula closer muscle of Aplysia californica.** *J Neurosci*. 1996 Dec 15;16(24):8092-104.
- Whittaker VP. **What is Dale's principle? In Coexistence of neuroactive substances in neurons** (Chan Palay & Palay Eds.) Wiley series in neurobiology. 1984.137 pp.
- Wilson P., Stewart and Akesson. **Autonomic Nerves.** B.C. Decker INC. Canada, 1997.
- Wolff JR, Kasa P, Dobo E, Wenthold RJ, Joo F. **Quantitative analysis of the number and distribution of neurons richly innervated by GABA-immunoreactive axons in the rat superior cervical ganglion.** *J Comp Neurol*. 1989;282:264-273.

- Yang B, Slonimsky JD, Birren SJ. **A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor.** Nature Neurosci. 2002;5:539-545.
- Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC. **Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle.** Neuron. 2001;29:131-143.
- Zimmermann H, Volkhardt W, Wittich B, Hausinger A. **Synaptic vesicle life cycle and synaptic turnover.** J Physiol Paris. 1993;87(3):159-70.
- Zupanc Günther, KH. **Peptidergic transmission: from morphological correlates to functional implications.** Micron. 1996. Vol.27, No.1. 35-91.

APENDICE I

- **Generalidades del Sistema Nervioso Autónomo (SNA)**

El SNA es la parte del sistema nervioso (SN) que controla las funciones viscerales denominadas autonómicas o vegetativas. Esta división regula esencialmente la función cardíaca, presión arterial, las secreciones exocrinas, la motilidad gastrointestinal, la sudoración, entre otras.

Esta parte del SN está controlada por centros localizados en el tallo cerebral e hipotálamo, así como en zonas de la corteza cerebral específicamente de la corteza límbica. A su vez el SNA está conformado por tres divisiones: simpática, parasimpática y entérica.

Las señales nerviosas autónomas pueden ser sensoriales o aferentes y motoras o eferentes. En el caso de las señales aferentes se transmiten por estímulos que se originan en el medio externo, como en la superficie del cuerpo y señales viscerales; estas señales se propagan por dos tipos de fibras: las fibras aferentes primarias y las aferentes entéricas, los somas de las primeras se localizan tanto en los ganglios de la raíz dorsal (por sus siglas en inglés, DG) de la médula espinal como en los ganglios sensoriales de los nervios craneales, desde estos sitios los axones llevan la información sensorial al sistema nervioso central (SNC). En el segundo tipo de fibras, los somas se encuentran en la división entérica y sus axones llevan la información a los ganglios simpáticos prevertebrales con la finalidad de controlar los reflejos viscerales (para revisión ver: Wilson et al, 1997; Guyton et al, 1998).

- **División simpática**

La información motora o eferente autonómica se transmite por medio de las vías eferentes motoras, formadas por las neuronas preganglionares y post-ganglionares simpáticas. En la división simpática las neuronas preganglionares se localizan en el asta intermediolateral (IML) de la médula espinal entre los segmentos C8-L3, aunque el 90% se localizan entre los segmentos T1-T3 (Nozdrachev et al, 2003; para revisión ver: Wilson et al, 1997; Watson and Kayalioglu 2009) (Figura A1).

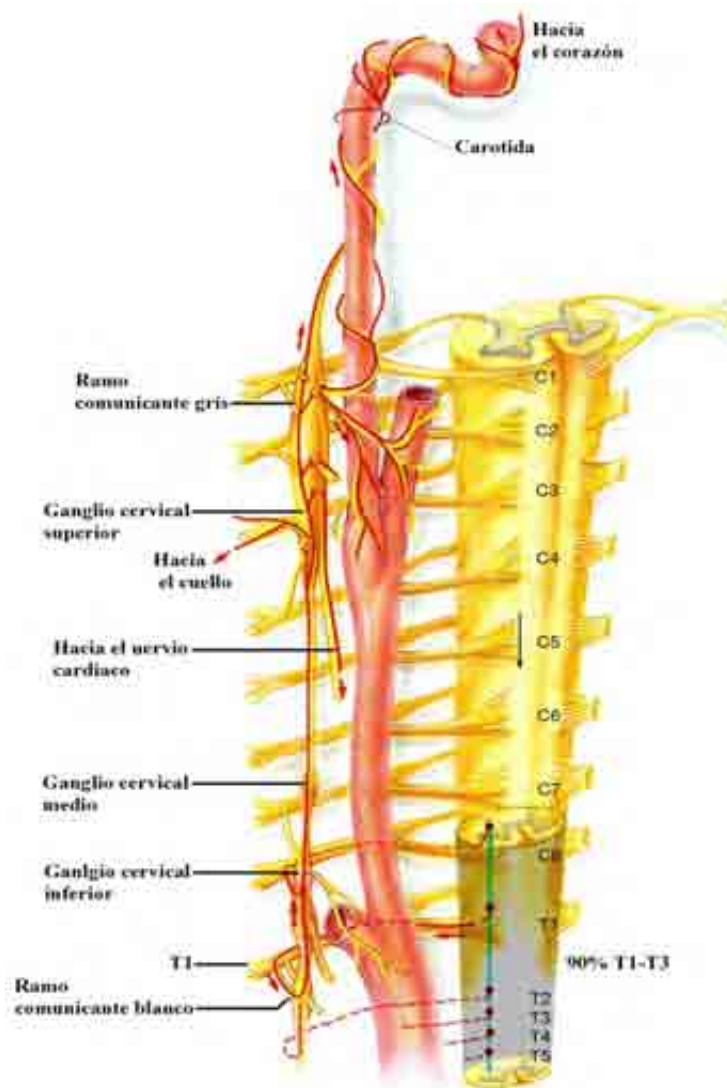


Figura A1. Esquema de la región cervico-torácica de la médula espinal donde se representan los segmentos torácicos que albergan las NPS (segmento de color gris). Estas NPS envían sus axones a través de los ramos comunicantes a los ganglios cervicales. Modificado de Wilson et al, 1997.

Los cuerpos celulares de las neuronas preganglionares simpáticas (NPS) se localizan particularmente en el núcleo intermediolateral pars principales (IMLp), aunque también se llegan a localizar en el pars funicularis (IMLf), otras pocas en el núcleo intercalado (IC) y en el área central autonómica (CA) (Dembowsky et al, 1985; Kukoff et al, 1985; Krukoff 1987; Nozdrachev et al, 2003; Anderson et al, 2009) (Figura A2).

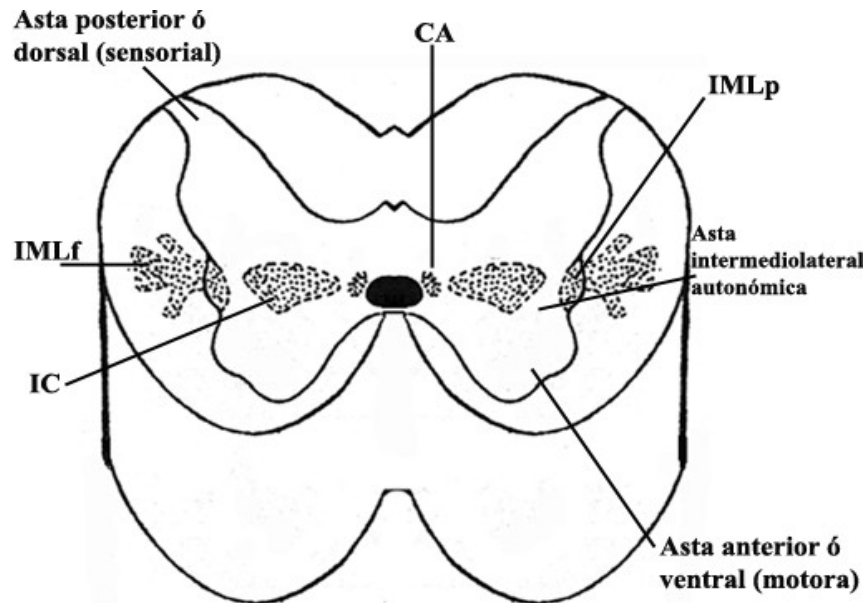


Figura A2. Esquema de un segmento transversal de la médula espinal donde se muestra la localización de las neuronas preganglionares simpáticas (NPS). Estas neuronas se localizan en la sustancia gris de las astas intermediolaterales de la médula espinal, particularmente en los núcleos intermediolateral pars principales (IMLp), aunque también en los núcleos intermediolateral pars funicularis (IMLf), núcleo intercalado (IC) y en el área central autonómica (CA).

Las NPS envían desde la médula espinal, sus axones por los ramos comunicantes blancos y grises a los ganglios de la cadena paravertebral simpática en donde hacen sinapsis con las neuronas ganglionares, también conocidas como post-ganglionares que envían sus axones a los órganos blanco. Esta sinapsis se conoce como sinapsis ganglionar autonómica y se encarga de relevar la información eferente motora por medio del transmisor clásico ACh (Anderson et al, 2009) (Figura A3).

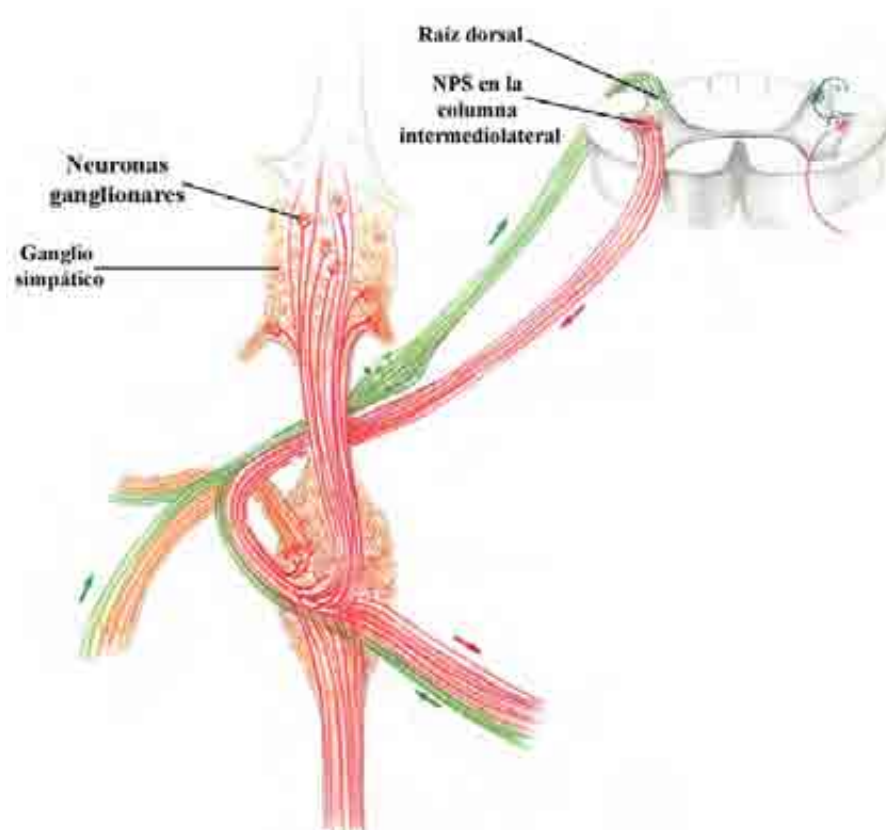


Figura A3. Esquema en el cual se representa la sinapsis ganglionar autonómica entre las neuronas preganglionares y ganglionares simpáticas. Las NPS que se localizan en el asta intermediolateral envían sus axones por el asta dorsal o motora de la médula espinal, los cuales se dirigen a través del tronco torácico simpático a uno de los ganglios de la cadena paravertebral simpática donde establecen sinapsis con las neuronas ganglionares. Modificado de Wilson et al, 1997.

- **Ganglios simpáticos**

En la cadena paravertebral se localizan los ganglios pertenecientes a la división simpática y los cuales forman tres grupos: 1) ganglios cervicales, 2) ganglios torácicos y lumbares superiores, y 3) ganglio lumbares bajos y todos los sacrales.

- 1) **Ganglios cervicales.** A esta división pertenecen 3 tipos de ganglios, los ganglios cervicales superiores, cervicales medios y cervicales inferiores; los cuales reciben inervación autonómica de neuronas preganglionares localizadas en la columna intermediolateral de algunos segmentos torácicos superiores de la médula espinal (Figura A4).

- **Ganglios cervicales superiores**, inervan estructuras ubicadas en tórax, corazón, cabeza y cuello: pulmón, iris, glándulas salivales.
 - **Ganglios cervicales medios**, son los más pequeños del grupo de los 3 cervicales, e inerva estructuras localizadas también en corazón y cuello.
 - **Ganglios cervicales inferiores**, en algunas especies puede encontrarse fusionado con el primer ganglio torácico y formar un ganglio grande y con forma de estrella, conocido como ganglio estelar. Este ganglio inerva corazón, la región inferior del cuello, brazos y las arterias craneales posteriores.
- 2) **Ganglios torácicos y lumbares superiores.** En total son 11 ganglios torácicos y reciben inervación de neuronas preganglionares localizadas en las astas intermediolaterales de la médula espinal, asociadas a los mismos nervios espinales.
- 3) **Ganglios lumbares bajos y sacrales.** Reciben inervación de neuronas de la región intermediolateral de segmentos torácicos inferiores y superiores lumbares la médula espinal. La región pélvica simpática, consiste de 4-5 ganglios sacrales en cada lado del sacro.

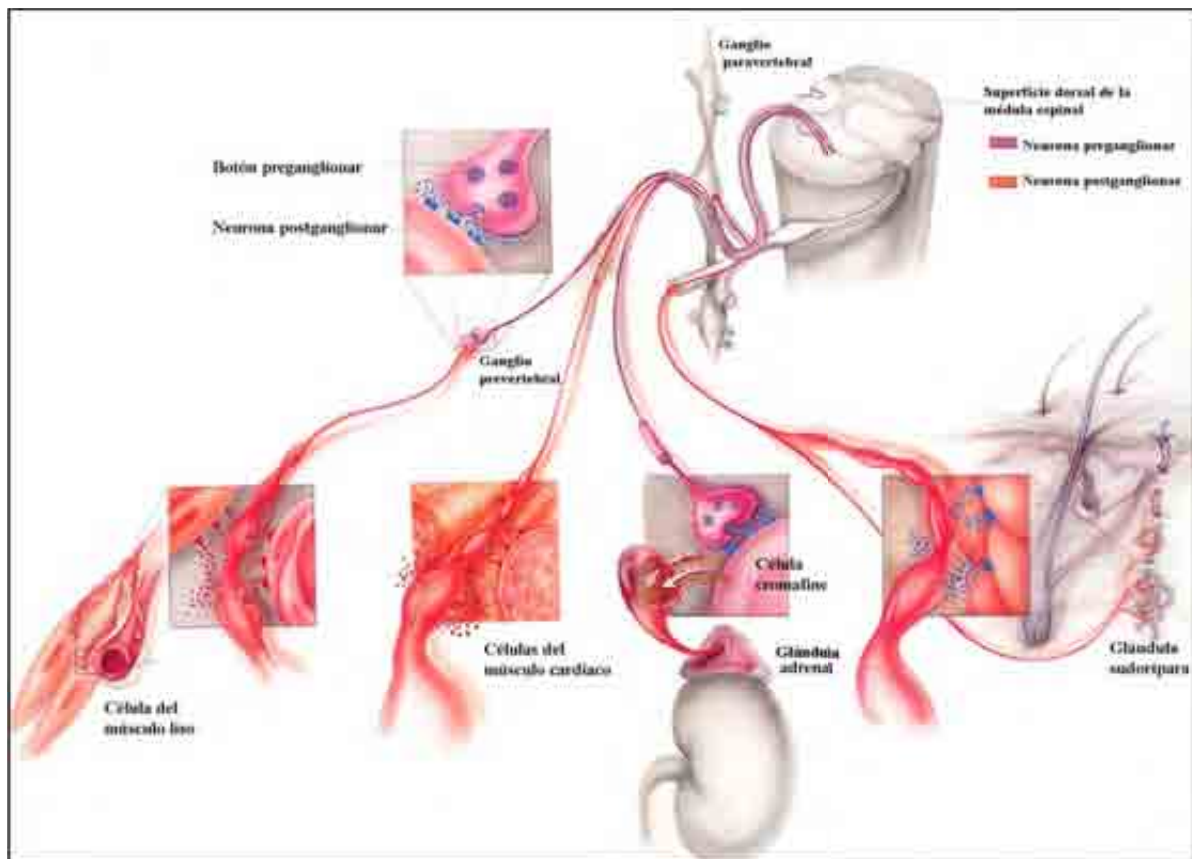


Figura A4. Esquema en el cual se representan algunos de los órganos blancos inervados por la sinapsis ganglionar autonómica. La sinapsis ganglionar autonómica está formada por las neuronas preganglionares simpáticas (NPS) de tipo colinérgico localizadas en las astas intermediolaterales de la médula espinal, y las neuronas post-ganglionares noradrenérgicas dentro de los ganglios simpáticos las cuales inervan diferentes órganos blanco. Las células ganglionares inervan células del músculo liso, del músculo cardíaco (miocitos cardíacos), glándulas sudoríparas, iris. En el esquema también se representan axones preganglionares colinérgicos que inervan directamente a una célula cromafina y la cual a su vez libera noradrenalina hacia la glándula adrenal. Modificado de Wilson et al, 1997.

- **División parasimpática**

En la división parasimpática las neuronas preganglionares, se encuentran en el tallo cerebral y el asta IML desde S2-S4; sus axones salen por la raíz ventral de la médula espinal y se dirigen los ganglios parasimpáticos en donde hacen sinapsis con las neuronas ganglionares, y al igual que en la división simpática las neuronas ganglionares envían sus axones a los diferentes órganos blancos (para revisión ver: Anderson et al, 2009).

Todos los órganos viscerales son inervados por ambas divisiones simpática y parasimpática, aunque sus efectos en ocasiones son antagónicos ya sea estimulando o inhibiendo.

- **División entérica**

Finalmente, la división entérica consiste en células nerviosas localizadas en la pared intestinal, que funcionan sin la intervención de la división simpática y parasimpática. Esta división controla principalmente la motilidad, secreción y absorción intestinal por medio de motoneuronas, neuronas sensoriales e interneuronas que reciben señales de los nervios simpáticos y parasimpáticos para producir una respuesta.

APENDICE II

Publicaciones de resultados del trabajo.

1. **Artículo publicado**, Sámano et al, 2006 (Synapse, 60:295–306).

De: John Johnson [mailto:jej123@sbcglobal.net]
Enviado el: Miércoles, 12 de Abril de 2006 06:05 p.m.
Para: M. Morales
CC: haganc@cadmus.com
Asunto: Synapse MS # 106AEP

M. Morales <mamm@biomedicas.unam.mx>
Synapse MS # 106AEP
April 12, 2006

Your manuscript (Synapse MS # 106AEP), entitled "Choline Acetyl Transferase and Neuropeptide Immunoreactivities are Colocalized in Somata, but Preferentially Localized in Distinct Axon Fibers and Boutons of Cat Sympathetic Preganglionic Neurons", has been reviewed and found to be acceptable for publication in Synapse without revision. Congratulations on fine work.

Your manuscript qualifies for color figure reproduction at no charge. Our Production Editor will be in touch with you about this.

Now that your manuscript has been accepted, please send a publication quality hard copy of the manuscript and figures, along with an electronic copy on CD-ROM or floppy disks, to our Production Editor, Ms. Carol Hagan at the following address:

Ms. Carol Hagan
Production Editor
DPS Ephrata
300 West Chestnut Street, Box 497
Ephrata, Pennsylvania 17522

Phone 800-238-3814 x 622
Fax 717-738-9444
E-Mail haganc@cadmus.com

Choline Acetyl Transferase and Neuropeptide Immunoreactivities are Colocalized in Somata, but Preferentially Localized in Distinct Axon Fibers and Boutons of Cat Sympathetic Preganglionic Neurons

C. SÁMANO, M.E. ZETINA, M.A. MAHÍN, F. CIFUENTES, AND M.A. MORALES*

Departamento de Biología Celular & Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Circuito Escolar s/número, Cd. Universitaria, México, D.F. 04510, México

KEY WORDS cholinergic; segregation; cotransmission; synapse; autonomic; neurotransmission

ABSTRACT Cholinergic sympathetic preganglionic neurons (SPN) coexpress the biosynthetic enzyme for acetylcholine, choline acetyl-transferase (ChAT), and neuropeptides such as enkephalin (ENK) in their cell bodies. However, it is not clear whether they also coexpress ChAT and neuropeptides in axon fibers and boutons. To explore coexpression of ChAT and neuropeptides in somata and axon processes of SPN, we investigated, using immunohistochemistry, retrograde labeling, confocal analysis, and tridimensional reconstruction, whether ChAT and the peptides neurotensin, methionine-ENK, somatostatin, calcitonin gene-related peptide, and vasoactive intestinal peptide colocalize in somata, axons fibers, and boutons of cat SPN. Practically, complete colocalization for these peptides and ChAT was observed in SPN somata. Conversely, in most instances we observed independent localization of immunoreactivity (IR) for ChAT and the peptides in axon fibers and boutons. The minor colocalization between ChAT- and peptide-IR in preganglionic fibers could correspond to a sequential axonal transport of ChAT and peptides, since we observed coexistence of these transmitters after blocking axonal transport. Contrary to Dale's principle, our results suggest that SPN can synthesize ChAT and peptides in their cell bodies and route them to distinct axon boutons or terminals in sympathetic ganglia. Presence of axon boutons containing either ChAT or neuropeptides lead us to suggest a new neurochemical pattern of cotransmission in sympathetic ganglia based on the concurrent release of transmitters and cotransmitters from distinct presynaptic boutons, rather than in the corelease of these mediators from the same axon process. The possibility that cellular segregation could be transient and depend on functional requirements is considered. *Synapse* 60:295–306, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Cotransmission has been described in synaptic junctions of sympathetic ganglia (Benarroch, 1994; Burnstock, 1976; Elfvin et al., 1993; Morales et al., 2004; Morris and Gibbins, 1992). Sympathetic preganglionic neurons (SPN) that establish synapses with postganglionic neurons use acetylcholine (ACh; detected by the immunoreactivity of its rate-limiting enzyme, choline acetyl transferase; ChAT) as a classical transmitter and coexpress several neuropeptides (Baldwin et al., 1991; Colomba-Benkmann et al.,

1995; Kondo et al., 1985; Krukoff, 1987; Krukoff et al., 1985; LaMotte and DeLanerolle, 1986; Reinecke et al., 1983; Yamamoto et al., 1988). Accordingly, it has been

Contract grant sponsor: CONACYT (México); Contract grant number: 6034; Contract grant sponsor: DGAPA PAPIIT (México); Contract grant number: IN-2037-02.

*Correspondence to: Miguel A. Morales, Apartado Postal 70-228, 04510, México, D.F. E-mail: manm@biomedicas.unam.mx

Received 9 January 2006; Accepted 12 April 2006

DOI 10.1002/syn.20060

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

assumed, although rarely demonstrated, that SPN expressing neuropeptides are also cholinergic. The co-occurrence of ChAT and enkephalin (ENK) has been described in the cell bodies of SPN (Colombo-Benkmann et al., 1995; Kondo et al., 1985); however, it is not clear whether ChAT and neuropeptides also co-occur in the axon fibers, including the boutons and terminals of these neurons. Indeed, the co-occurrence of ChAT or the vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) and neuropeptides, such as ENK and neurotensin (NT), infrequently occurs in the axon boutons of these neurons (Chanthapavong et al., 2003; Jiménez et al., 2002; Lindh et al., 1986; Morales et al., 1995). Thus, many preganglionic axon boutons and terminals immunoreactive to NT or ENK are not immunoreactive to ChAT or VAcHT. Furthermore, in preliminary communications, we have shown that ChAT co-occurs in perikarya with various peptides, including NT or methionine-enkephalin (Met-ENK), but not in a large population of the axon boutons of the cat SPN (Morales et al., 2003; Sámano et al., 2002).

Although various studies have described the localization and colocalization of neurotransmitters in preganglionic sympathetic neurons, an integrative study that explores these neurons and their processes remains to be conducted. Therefore, using immunohistochemistry, retrograde labeling, confocal analysis, and tridimensional reconstruction, we investigated the colocalization of ChAT and the peptides NT, Met-ENK, somatostatin (SOM), calcitonin gene-related peptide (CGRP), and vasoactive intestinal peptide (VIP) in somata, axons fibers, and boutons of SPN in the spinal cord, sympathetic thoracic trunk (STT), and stellate ganglia (SG) of the cat. Immunoreactivity to ChAT and these neuropeptides colocalized in cell bodies, whereas almost no colocalization was observed in axon fibers of the STT and axon boutons of the SG.

MATERIALS AND METHODS

Acute and chronic experiments were carried out on adult cats of both sexes (2.5–3.5 kg). Animals were treated in accordance with the ethical guidelines for the care and use of laboratory animals from the National Academy of Sciences of the United States

and approved by our Bioethical Committee. Cats used for retrograde labeling (4) or ligation of preganglionic nerves (5) were anesthetized with sodium pentobarbital (35 mg/kg i.p., followed by a maintenance dose of 3 mg/kg i.v.) and intubated endotracheally for artificial ventilation in case of respiratory arrest. The femoral vein was catheterized for drug administration. The STT was dissected and either sectioned or tied at the level of the third thoracic white rami (T3) 3–5 mm caudal to the SG. For retrograde labeling, the tracer Fluorogold (Fluorochrome, LLC, Denver, CO) was applied at the distal end of the STT via a pulled glass pipette; in experiments to stop axonal transport, the nerve was tied up with a 0.5 mm diameter nylon thread. After 3 days (tracing) or 1 day (tying), cats were reanesthetized and transcardially perfused with 300 ml ice cold phosphate buffer solution (0.01 M PBS, pH 7.4) for 3 min, followed by 1000 ml of ice cold fixative solution (2% paraformaldehyde, 0.18% picric acid in 0.1 M PBS, pH 7.4) for 40 min. Thoracic segments 2 (T2) to 6 (T6) of the spinal cord were removed and postfixed in the same fixative solution (overnight) and cryoprotected in an increasing 10 to 30% sucrose solution.

In acute experiments, cats were anesthetized and perfused as described above. Segments T2 to T6 of the spinal cord, segments at the level of T3 and T6 of the STT, and the SG were removed, postfixed overnight in the same fixative solution as described above, and cryoprotected in a 30% sucrose solution. Horizontal and transverse sections of the spinal cord, longitudinal and transverse sections of the STT, and longitudinal sections of the SG were cut at 14 μ m thickness in a cryostat at -20°C . The tissues were randomly sampled, recovering at least four sections on gelatin-coated slides and processed for single or double immunolabeling. Sections were preincubated with 5% bovine serum albumin (2 h) and then incubated overnight in a humid atmosphere at room temperature, with a single primary antibody against ChAT or against one of the following peptides: NT, Met-ENK, VIP, CGRP, and SOM (Table I). Sections were then rinsed twice for 10 min in PBS-Tx (0.1 M PBS, 0.3% Triton X-100) and incubated for 2 h in secondary antibody. To reveal ChAT we used a biotinylated antibody (antigoat IgG) followed by avidin-biotin complex conjugated with Texas Red (TxR). The secondary antibodies used for peptide labeling were coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC; Table I). To prevent cross-reactivity and/or bleed-through as a false positive artifact in double labeling experiments, immunostaining for each antigen was carried out separately. Immunostaining for ChAT was carried out first, and then a different combination of primary and secondary antibodies was used in immunostaining to reveal the peptide of interest. For controls, ChAT and all the peptides explored were preabsorbed overnight at room temperature with 0.1 μ M ChAT (Chemicon, Temecula,

Abbreviations

SPN	sympathetic preganglionic neurons
ChAT	choline acetyl-transferase
ACH	acetylcholine
IR	immunoreactivity
NT	neurotensin
Met-ENK	methionine enkephalin
SOM	somatostatin
CGRP	calcitonin gene-related peptide
VIP	vasoactive intestinal peptide
VAcHT	vesicular acetylcholine transporter
STT	sympathetic thoracic trunk
SG	stellate ganglia
FITC	fluorescein isothiocyanate
TxR	Texas red

TABLE I. Antibodies used for immunofluorescence labeling

Antiserum	Type of antibody	Coupled to	Dilution	Origin
Primary				
ChAT (human)	Goat polyclonal	—	1:200, 1:150	Chemicon, Temecula, CA
NT (bovine)	Rabbit polyclonal	—	1:200	Incstar, Stillwater, MN
Met-Enk (bovine)	Rabbit polyclonal	—	1:250, 1:200	Donated by M. Asai from IMP, Mexico
CGRP (synthetic)	Rabbit polyclonal	—	1:250, 1:100	Diasorin, Stillwater, MN
SOM (synthetic)	Rabbit polyclonal	—	1:250, 1:100	Diasorin, Stillwater, MN
VIP (synthetic)	Rabbit polyclonal	—	1:250, 1:100	Diasorin, Stillwater, MN
Secondary				
α Rabbit IgG	Rat	FITC	1:200	Zymed, San Francisco, CA
α Goat IgG biotinylated	Horse	Avidin DCS-Texas Red	1:100, 1:200	Vector, Burlingame, CA

CA) or 1 μ M of the respective peptide (Sigma, St. Louis, MO); also as control, sections were processed through all the incubation steps with primary antibodies omitted. Finally, sections were cover-slipped with fluorescence-mounting medium (Vectashield, Vector, Burlingame, CA) and examined with an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse) equipped with filters for FITC, TxR, and Fluorogold. Selected sections were further analyzed with a confocal LSM 5 Pascal Zeiss microscope equipped with an argon/krypton laser. Images were collected with a 1.30 numerical aperture (NA) oil-immersion 100 \times objective. To avoid bleed-through, FITC labels were excited with the 488 line and emitted light was band-passed with a 520–550 nm filter, and TxR labels were excited with the 543 line and emitted light was long-passed with a 650-nm filter. Confocal images were obtained using two separate photomultiplier channels, either concurrently or in separate runs. Images were separately projected and merged using a pseudocolor display showing green for FITC, red for TxR, and yellow for colocalization.

For quantification of SPN cell bodies expressing one or both markers, in transverse sections of the spinal cord (four animals), we sampled T4–T5 and counted the number of cell bodies positively immunolabeled for ChAT, for the particular peptide analyzed, and for both molecules (coexistence) in the intermediolateral nuclei. The number of cell bodies immunopositive for each antigen was expressed as a percentage of the total immunolabeled SPN population. The coexistence of ChAT with peptides in the SG and the STT was assessed in 36 and 26 image-sections from four animals (5–11 images for cat). Immunolabeled axon fibers and boutons were selected using the Metamorph image analysis system (Universal Images, West Chester, PA); mean and standard deviation of background levels were measured, we considered specific labels, those labels with intensities greater than mean + 2 SD of the background level. Fibers immunopositive for ChAT, for each peptide analyzed, and for both ChAT and each peptide, were expressed as a percentage of the total population of fibers positive for ChAT and/or for each peptide. Likewise, we calculated the percentage of ChAT- and peptide-immunolabeled fibers that expressed coexistence.

For tridimensional reconstructions, with the support of the experts from the Department of Tridimensional Visualization of the National Autonomous University of Mexico, a series of 12 confocal optical sections, 0.25 μ m thickness, of STT, double stained against ChAT and NT, were processed using the Amira software (Template Graphics Software, San Diego, CA) in a SGI Onyx 350 visualization system (Silicon Graphics, Mountainview, CA). From the final volumetric merged images, the channel for ChATIR (red) and for NTIR (green) were displayed separately.

RESULTS

ChAT-immunoreactive perikarya in the intermediate gray region of the spinal cord

Immunoreactivity to ChAT (ChAT-IR) was mainly detected in the cell bodies of neurons bilaterally located in the lateral horns of the spinal cord. Transverse sections showed clusters of 6.7 ± 0.4 ChAT-IR neurons located in the intermediolateral nucleus pars principalis (IMLp). A smaller number of ChAT-IR neurons occurred sporadically in the intercalate nucleus (IC), the intermediolateral nucleus pars funicularis (IMLf) overrunning the lateral funiculus (LF) (Fig. 1). Most labeled neurons were fusiform, although some were rounded with diameters ranging from 25 to 40 μ m. Several larger ChAT-IR cells, presumably skeletal muscle motoneurons, were consistently detected in the ventral horns. Most ChAT-IR neurons located in the intermediolateral nuclei were retrogradely labeled with Fluorogold tracer applied to the ipsilateral thoracic sympathetic trunk (Fig. 1a), corroborating their preganglionic nature. Controls, with either no primary antibodies added or antibody preabsorption with the appropriate antigen, were negative.

Localization of NT-, Met-ENK-, SOM-, CGRP-, and VIP-immunoreactive neurons and colocalization with ChAT-IR in neurons of the intermediate gray region of the spinal cord

In addition to the ChAT-IR described above, NT-, Met-ENK-, SOM-, CGRP-, and VIP-IR were detected in neuronal cell bodies located in the intermediate

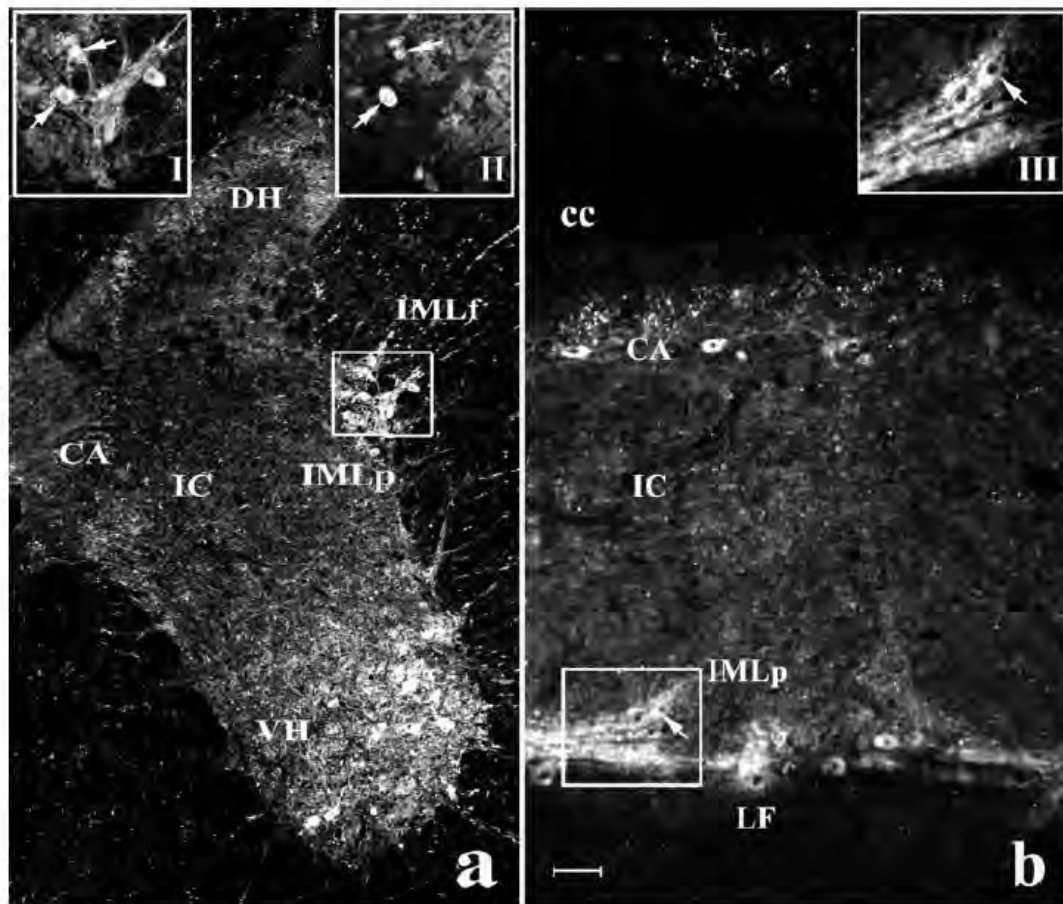


Fig. 1. Micrograph of ChAT immunoreactivity and retrograde labeling of spinal cord neurons. Transverse (a) and horizontal (b) sections of the spinal cord at the T4 level are shown. ChAT-immunoreactive (ChAT-IR) cell bodies were mainly detected in the nuclei of the lateral horn (amplifications of these areas are shown in insets); some of these ChAT-IR neurons were retrograde-labeled with the tracer Fluorogold, which was applied in the ipsilateral thoracic sympathetic trunk

(insets I and II show double label of ChAT-IR and Fluorogold staining, inset II shows 2 Fluorogold labeled cells (arrows) of the ChAT-IR cell bodies showed in inset I). ChAT-IR was also detected in motoneurons of the ventral horn (VH). DH: Dorsal horn; IMLf: intermediolateral nuclei pars funicularis; IMLp: intermediolateral nuclei, pars principalis; CA: central area; IC: intercalated area; LF: lateral funiculus; cc: central canal. Calibration: 100 μ m (40 μ m insets).

gray region of the spinal cord (Fig. 2). In contrast with the number of ChAT-IR neuronal somata, we found only 3.4 ± 0.3 NT-IR, 2 ± 0.3 Met-ENK-IR, 2 ± 0.2 SOM-IR, 2 ± 0.2 CGRP-IR, and 4.3 ± 0.4 VIP-IR neurons per nuclei (Figs. 2 and 4). A dense network of Met-ENK-IR varicose fibers was also observed across whole transverse sections of the spinal cord. Immunoreactivity for NT was also detected in what were presumably motoneurons in the ventral horn. A network of fibers intensely immunoreactive for CGRP was also observed in the dorsal horn.

Double immunolabeling experiments showed that all SPN cell bodies immunolabeled for the different

peptides expressed ChAT-IR (Figs. 2 and 4). In contrast, and as expected, only a subset of these ChAT-IR cell bodies expressed each of the peptides explored. Thus, from the total cell bodies immunopositive for ChAT, we found that $52.3 \pm 5\%$, $32.8 \pm 7.1\%$, $41 \pm 6.3\%$, $37.3 \pm 2.6\%$, and $45.1 \pm 5\%$ coexpressed NT, Met-ENK, SOM, CGRP, and VIP, respectively (Figs. 2 and 4). These neurons were clearly detected in transverse and horizontal sections, mainly in the IMLp and IMLf (Fig. 2). A few scattered neurons, generally located outside the autonomic nuclei, were immunoreactive for some of the peptides explored, but not for ChAT.

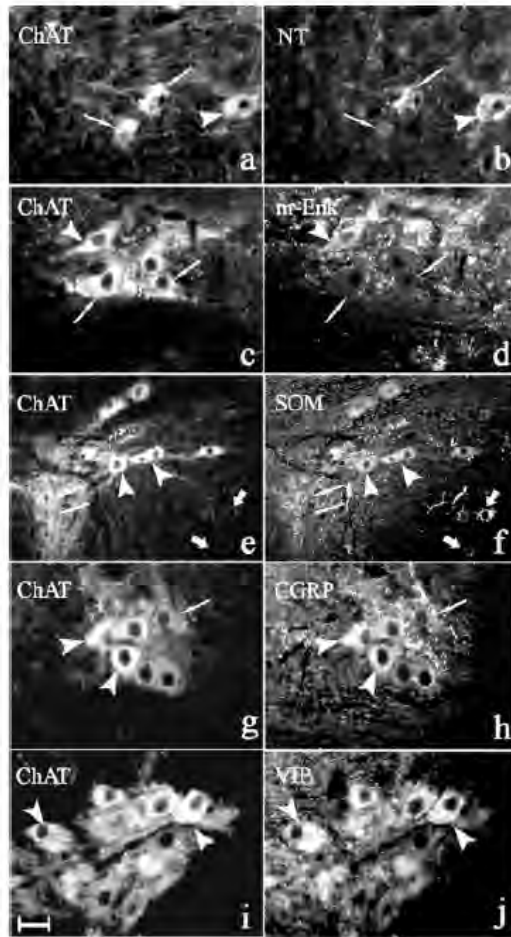


Fig. 2. Double immunostaining for ChAT and different peptides in horizontal (a-f) and transversal (g-j) sections of the spinal cord. ChAT-NT (a, b); ChAT-Met-ENK (c, d); ChAT-SOM (e, f); ChAT-CGRP (g, h); ChAT-VIP (i, j). All cell bodies immunoreactive for the neuropeptides located in the intermediolateral nuclei were also immunoreactive for ChAT (arrowheads). Some ChAT-IR cell bodies were negative for the peptides (small arrows). Few cells were immunoreactive for SOM and negative to ChAT (arrows), these cells were usually not located in the sympathetic preganglionic nuclei. Calibrations: a-d, g-j, 50 μ m; e and f, 100 μ m.

Localization of immunoreactivity for ChAT, NT, Met-ENK, SOM, CGRP, and VIP in distinct preganglionic axon boutons within the stellate ganglia

ChAT-IR was abundant in most preganglionic fibers and axon boutons in the neuropil of the SG; it was present in $81.6 \pm 2.1\%$ of the total immunostained preganglionic fibers. ChAT-IR fibers, showing a smooth appearance with some periodical varicosities, were ob-

served along the entire ganglion. Some of these axon fibers extended for several microns, whereas others surrounded ganglionic neurons (Fig. 3). In addition to the preganglionic fibers, some ChAT-IR ganglionic neurons were observed. Immunoreactivity for the various peptides was consistently detected as a varicose pattern in numerous preganglionic axon boutons and terminals, and immunoreactivity for NT was the most abundant of the explored peptides: $36.4 \pm 6\%$ of the total population of fibers stained to ChAT and NT. Immunoreactivity for Met-ENK, SOM, CGRP, and VIP was detected in $25.3 \pm 2.5\%$, $22.9 \pm 3.6\%$, $24.5 \pm 2.8\%$, and $23.8 \pm 7.7\%$ of the total fibers immunopositive to ChAT and to the respective peptides (Figs. 3 and 4). Met-ENK-IR fibers and boutons formed concentric rings around some ganglionic cells. Immunoreactivity for CGRP was detected in thick, smooth fibers located preferentially in areas distant from ganglionic cell bodies, which may correspond to sensory fibers, as well as in smaller, less numerous, varicose fibers that were intermingled with ganglion cells. Immunoreactivity for VIP and CGRP was also detected in ganglionic cells.

Double immunostaining revealed localization for ChAT and each explored peptide preferentially in distinct axon fibers and boutons (Figs. 3 and 4). Thus, for ChAT and NT, only $12 \pm 2.2\%$ of the fibers showed colocalization of both compounds, which corresponds to $17.4 \pm 3.5\%$ of the total ChAT-IR fibers and $36.5 \pm 4.1\%$ of the total NT-IR fibers. As shown in Figure 4, coexistence of ChAT-IR with immunoreactivity for each of the other peptides was also very low in axon fibers and boutons: $10 \pm 1.3\%$, $10.3 \pm 1.2\%$, $4.1 \pm 1\%$, and $7.2 \pm 3.3\%$ for Met-ENK, SOM, CGRP, and VIP, respectively. These values represent $11.6 \pm 1.2\%$, $12.1 \pm 1.7\%$, $5.2 \pm 1.2\%$, and $10.1 \pm 5\%$ of the total ChAT-IR fibers, and $44.1 \pm 9.2\%$, $50 \pm 4.6\%$, $16.1 \pm 3.4\%$, and $25.5 \pm 5.5\%$ of the total immunoreactivity for the respective peptides (Fig. 4). Fibers immunopositive for the peptides only were located far from ChAT-IR fibers (100–500 μ m) or intermingled with ChAT-IR boutons. CGRP-IR fibers showed the least amount of colocalization with ChAT-IR fibers ($16.1 \pm 3.4\%$), and SOM-IR fibers showed the highest amount of colocalization with ChAT-IR fibers ($50 \pm 4.6\%$). Detailed confocal examination of SG sections double immunolabeled for ChAT and NT revealed an apparent single varicose axon fiber with distinct regions (varicosities) positively stained for NT, ChAT, or both molecules, along the fiber (Fig. 5).

Independent localization of immunoreactivity to ChAT, NT, VIP, CGRP, and Met-ENK in preganglionic axons of the sympathetic thoracic trunk

Immunostaining was performed on transverse sections of the STT from two regions: 4–6 mm caudal to

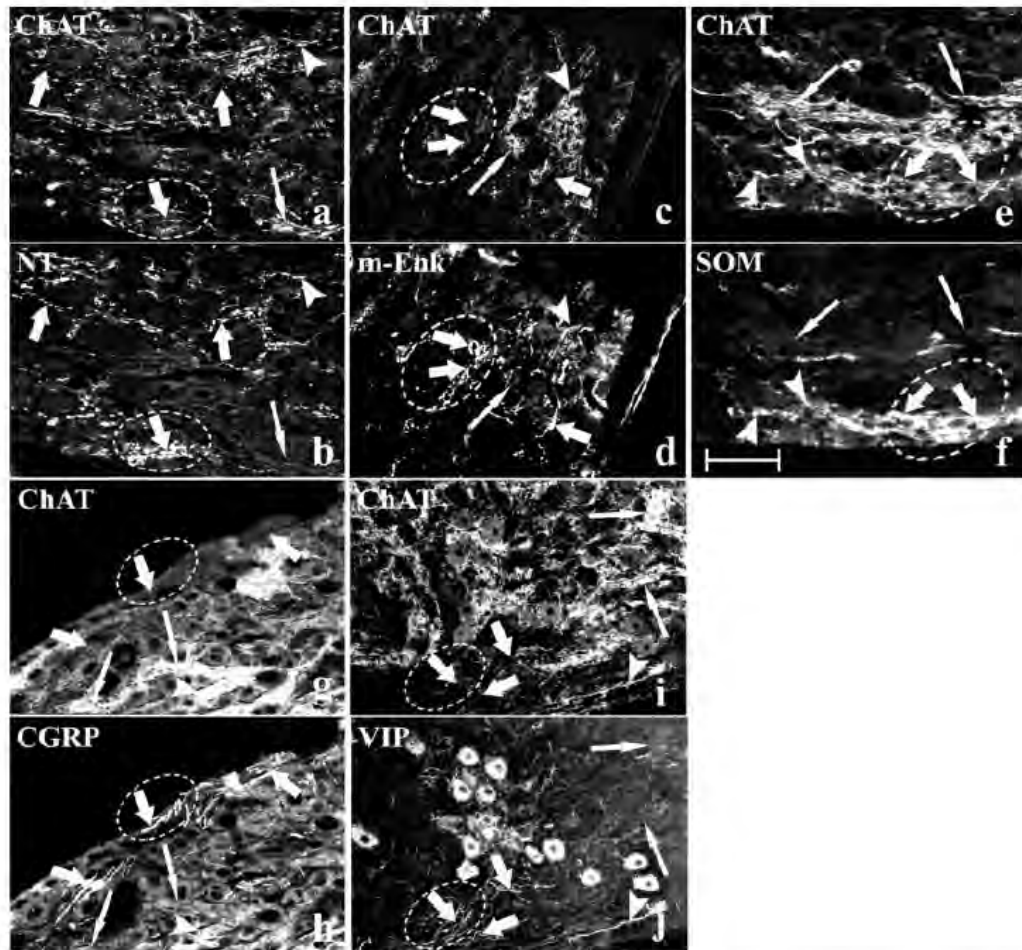


Fig. 3. Double immunostaining for ChAT and different peptides in longitudinal sections of the stellate ganglia (SG), showing the axon boutons and terminals of preganglionic sympathetic neurons. ChAT-NT (a, b); ChAT-Met-ENK (c, d); ChAT-SOM (e, f); ChAT-CGRP (g, h); ChAT-VIP (i, j). Almost no colocalization of immunoreactivity for ChAT and the peptides was found. Circled areas showed

fibers immunolabeled to each peptide but not to ChAT (arrows); fibers immunolabeled to ChAT and negative to the peptides (small arrow) are also distinguished. A few fibers showed colocalization of ChAT and peptide immunoreactivities (arrowheads). Calibration: a and b, 50 μ m; c-j, 100 μ m.

the SG, where the white ramus of the third thoracic segment (WR-T3) joins the STT, and near the WR-T6 exits (70–80 mm caudal of the SG). In both regions, axon fibers immunoreactive for ChAT, NT, VIP, CGRP, and Met-ENK were observed (Fig. 6). No SOM-IR fibers were detected. ChAT-IR fibers were widely and homogeneously distributed within the complete area of the nerve comprising $75.7 \pm 1.5\%$ of the total number of axon fibers immunopositive for ChAT and for each peptide. Fibers immunopositive for NT, Met-ENK, CGRP, and VIP corresponded to $34.9 \pm 1.9\%$,

$27.8 \pm 2.8\%$, $35 \pm 6.1\%$, and $30.7 \pm 2.6\%$ of the total immunostained fibers (Figs. 4 and 6). Immunopositive peptide fibers were scattered in discrete clusters across the nerve. To corroborate that fluorescent staining was not due to scattered background fluorescence but corresponded to nerve axons, we counterstained nerve sections with Fluorogold, which unexpectedly labeled myelin rings. The results showed that ChAT-IR corresponded to preganglionic axoplasm areas, as the fluorescence consistently occurred within the Fluorogold-stained myelin rings (Figs. 6a–6c).

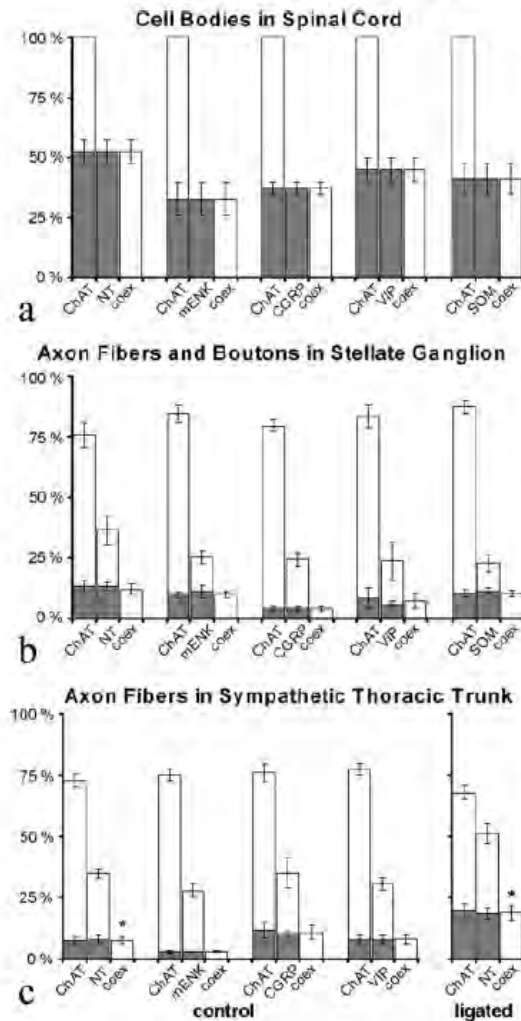


Fig. 4. Percentage of cell bodies, axon fibers, and boutons of the SPN immunolabeled for ChAT, for the different peptides, and for ChAT and each peptide (coexistence). Empty bars show the total amount of immunolabeling for each antigen (ChAT, peptide and coexistence) and the shadowed bars represent the percentage of this label that coexisted in: cell bodies (a); axon fibers and boutons (b); and axon fibers (c); respectively. While some ChAT-IR cell bodies coexpress each of the peptides, 100% of the somata immunoreactive for each peptide express ChAT. A vast percentage of fibers that were immunopositive for the peptides were negative for ChAT. After ligation, the percentage of coexistence for ChAT- and NT-IR in sympathetic preganglionic axon fibers, shown in c, significantly increased, $P < 0.05$ (Student's *t*-test, $n = 5$); mean \pm SE.

Double immunostaining showed that immunoreactivities for ChAT and each peptide were independently located in distinct axon fibers. Thus, double immunolabeling for ChAT and NT showed that only $7.6 \pm 1.3\%$

of the fibers coexpressed both antigens, which represent $10.3 \pm 1.6\%$ of the total ChAT-IR fibers and $22.3 \pm 4.4\%$ of the total NT-IR fibers. As shown in Figure 4, coexistence of ChAT-IR with immunoreactivities for the other peptides was also low: $2.9 \pm 0.4\%$, $10.8 \pm 2.8\%$, and $8 \pm 1.9\%$ for Met-ENK, CGRP, and VIP, respectively (Fig. 4). These values represent $3.9 \pm 0.6\%$, $15.3 \pm 4.3\%$, and $10.2 \pm 2.3\%$ of the total number of ChAT-IR fibers, respectively, and $10.2 \pm 1\%$, $28.4 \pm 3.7\%$, and $25.2 \pm 5.3\%$ of the total number of Met-ENK-, CGRP-, and VIP-IR fibers, respectively (Fig. 4). Considering that SPN axons do not ramify before they reach the sympathetic ganglia, and that ChAT and the various neuropeptides explored are transported to axon terminals, we expected to find a higher degree of colocalization between ChAT and the peptides in the axoplasm. To further assess these results, we analyzed the immunoreactivities of ChAT and the peptides in longitudinal sections of the STT by confocal microscopy and tridimensional reconstruction studies. We found that immunoreactivities were distributed relatively independently along the nerves: immunoreactivity for ChAT occurred along most of the fiber length, whereas peptide-IR was sparse (Figs. 7a and 7b). To explore if this successive distribution of ChAT-IR and peptide-IR along the axon fibers was due to the sequential axonal transport of these molecules, we stopped axonal transport by ligating the preganglionic nerve, and then looked at the distribution of immunoreactivity for ChAT and each peptide. Colocalization of immunoreactivity for ChAT and the peptides increased significantly after the ligation. For example, colocalization of ChAT-IR and NT-IR occurred in $7.6 \pm 1.3\%$ of the total immunolabeled areas before the ligation, whereas after the ligation, colocalization increased to $19 \pm 3\%$; Student's *t*-test showed significant increase ($P < 0.05$, $n = 5$) (Figs. 7c-7e).

DISCUSSION

This is the first integrative study addressed to characterize the presence and cooccurrence of ChAT and neuropeptides in the cell bodies and axon processes of SPN. We found a mismatch between the co-occurrence of the acetylcholine synthetic enzyme ChAT and the neuropeptide cotransmitters, NT, Met-ENK, SOM, VIP, and CGRP, in somata compared with axon fibers and boutons. Although immunoreactivity to ChAT colocalized with immunoreactivity to these neuropeptides in perikarya, no colocalization was observed in the majority of axon processes.

We immunostained the rate-limiting enzyme of ACh synthesis and not the classical transmitter itself, since it is generally accepted to use this immunoreactivity as a true marker for ACh (Kondo et al., 1985; Lindh et al., 1986; Morales et al., 1995); in fact, ChAT has been demonstrated to match almost perfectly the

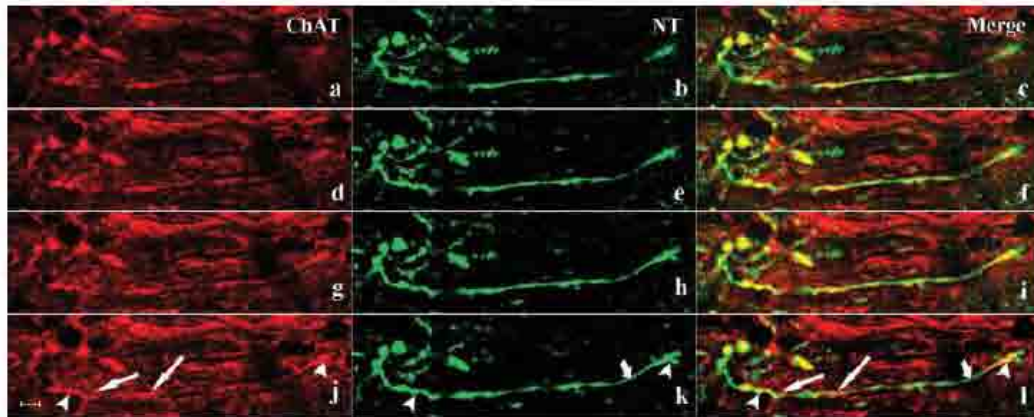


Fig. 5. Confocal images of sections of SG immunoreactive for ChAT and NT. Images were taken from 11 optical serial sections of 0.250 μm throughout the Z-axis. Immunolabel to ChAT is shown in red (a, d, g, j), to NT in red (b, e, h, k), the right column (c, f, i, l) show the merge images. Immunolabels only to NT (small arrows), ChAT (arrows), or to both molecules (head arrows) are shown in distinct zones (varicosities) of a (presumably) single preganglionic axon fiber. Calibration: 5 μm .

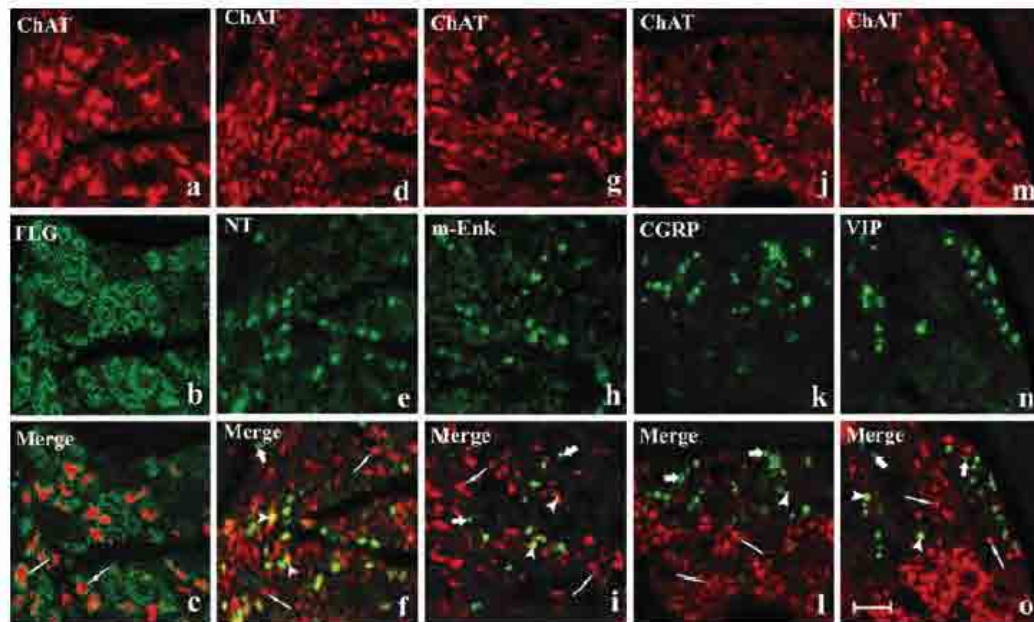


Fig. 6. Micrographs of transverse sections of the sympathetic thoracic trunk at the level of T3, 5–7 mm caudal to the SG, immunoreactive for ChAT and for different peptides. Confocal images of section immunolabeled to ChAT (a), counterstained with Fluorogold (b), and the merged image (c); immunostaining for ChAT can be seen in red, specifically inside the Fluorogold green-labeled myelin rings. Double immunolabeling for ChAT and NT (d–f), ChAT and Met-ENK (g–i), ChAT and CGRP (j–l), and ChAT and VIP (m–o), show mainly a location of ChAT and peptide immunoreactivities in distinct axon fibers. The merged images show axons immunoreactive to ChAT and negative to peptide (small arrow), immunoreactive to peptide and negative to ChAT (arrows), and very few immunoreactive to both (arrowhead). SOM did not reach a detectable level. Calibration: a–c, 5 μm ; d–o, 10 μm .

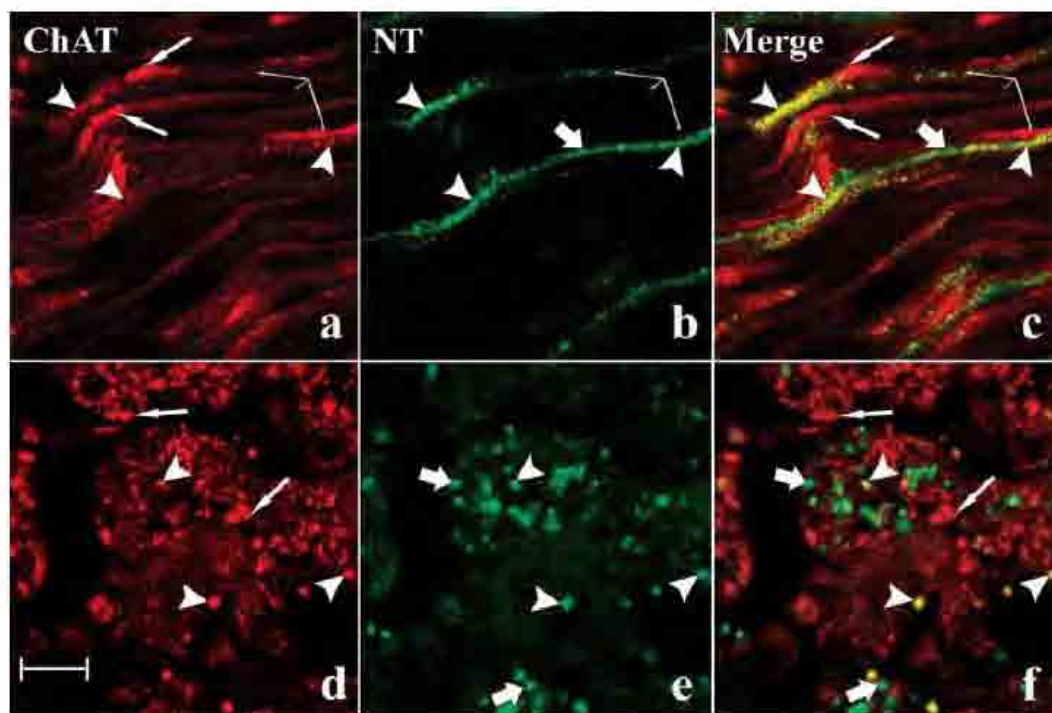


Fig. 7. Tridimensional reconstruction of a longitudinal sections of the sympathetic thoracic trunk from a series of 12, 0.25 μm optical sections throughout the Z-axis (a-c), and confocal micrographs of transverse sections of the STT immunostained for ChAT and NT after axonal transport was stopped (d-f). (a, d) ChAT-IR, (b, e) NT-IR, and (c, f) merge image. Some of the reconstructed axon fibers are mostly immunolabeled for ChAT (small arrows), while others

clearly showed a mixed arrangement of immunolabels, with predominance of NT-IR (arrows), or ChAT-IR (small arrows) or both labels (head arrows); axes are shown in (a-c) for orientation purposes. In the lower row, the blockage of axonal transport leads to an increase in the amount of axon fibers showing colocalization of ChAT- and NT-IR (yellow labels, with arrowheads). Calibration: a-c, 4 μm ; d and f, 10 μm .

reactivity expressed by an ACh antibody in the central nervous system (Geffard et al., 1985a,b). Moreover, it is also known that at least the membrane bound form of ChAT (mChAT, which is recognized by the antibody used here) is associated with synaptic vesicle membranes (Sha et al., 2004), indeed at electron microscopy we have found immunoperoxidase staining for ChAT in close apposition to synaptic vesicle membranes in preganglionic boutons (unpublished data).

Double immunostaining revealed the co-occurrence of ChAT with the peptides, NT, SOM, CGRP, Met-ENK, and VIP in cell bodies of SPN, confirming the co-occurrence of ChAT and ENK in the soma of these neurons (Colombo-Benkmann et al., 1995; Kondo et al., 1985). We have previously detected the incomplete co-occurrence of ChAT with either NT or Met-ENK in preganglionic nerve fibers of the cat SG (Jiménez et al., 2002). In the present study, we found that ChAT-IR and NT-, SOM-, Met-ENK-, CGRP- or VIP-IR colocalized in no more than 13% of the total of preganglionic

axon boutons and terminals in sympathetic ganglia. Furthermore, ChAT- and peptides-IR occurred in distinct axons in transverse sections of preganglionic nerve, but after the interruption of axonal transport, by ligation of the nerve, co-occurrence of ChAT- and NT-IR was significantly enhanced.

In accordance with our findings, other studies in superior cervical ganglia of guinea pig and rat have reported the presence of preganglionic fibers that are ENK-IR but not ChAT-IR or VAcHT-IR (Chanthaphavong et al., 2003; Lindh et al., 1986; Morales et al., 1995). In the most recent study, it was proposed that the lack of complete colocalization between VAcHT-IR and ENK-IR may result from different subcellular localizations of these markers, such as different populations of vesicles immunostained with different markers within the same presynaptic boutons. This possibility might explain the independent close localization of ChAT and peptide immunoreactivities; however, it cannot account for different immunolabels located farther than 1–2 μm (bouton size), which cannot occur

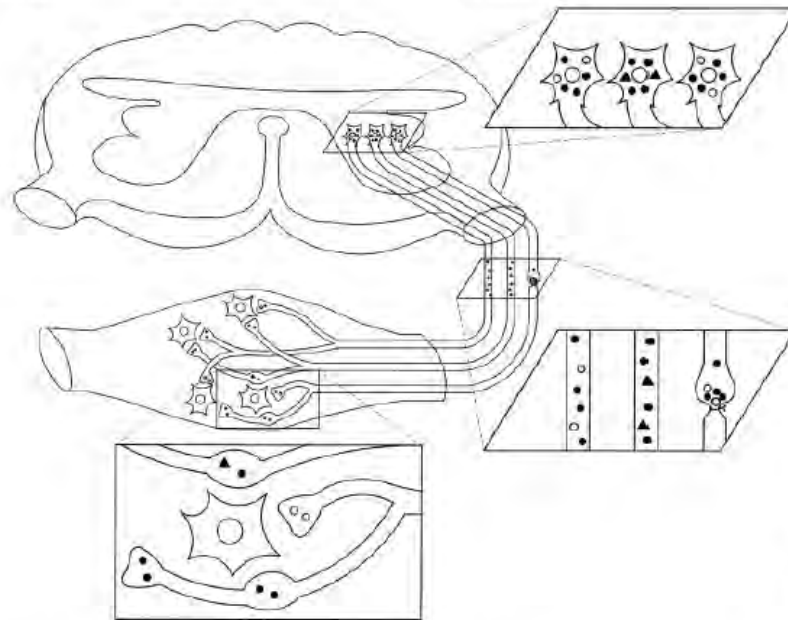


Fig. 8. Scheme of the sympathetic preganglionic neurons and transmitters. Acetylcholine (filled circles) co-occurred with different peptides (triangles and open circles) in perikarya. Transmitters are sequentially sent to the axon boutons and terminals of the preganglionic fibers in the sympathetic ganglia, through axonal transport. Once in the ganglia, each transmitter can be differentially routed to distinct axonal processes. Transmitters can be accumulated in the swollen fibers after axonal transport is stopped.

within the same axon bouton. To account for the presence of preganglionic fibers immunoreactive for a peptide but not for ChAT, we have considered two possibilities. Firstly, peptidergic fibers might originate from sympathetic preganglionic noncholinergic peptidergic neurons; however, all of the SPN somata immunoreactive for peptides were immunoreactive for ChAT. Secondly, the axon boutons and terminals immunoreactive for peptides, for ChAT, or for both molecules may belong to the same neurons. This implies that SPN synthesize and store ChAT and peptides in their cell bodies, but route them toward distinct axonal processes, located either in close proximity or quite distant (several hundreds of microns) from each other. An additional alternative to be considered is that preganglionic fibers immunoreactive to peptides do contain ChAT, but in concentrations below the immunodetection level; in any case, this possibility also supports the proposal that SPN may route substantially different amount of ChAT to distinct axonal processes.

It is known that ChAT is transported to axon terminals by slow anterograde axonal transport, whereas neuropeptides are transported within vesicles through fast axoplasmic transport (Hirokawa, 1997; Tuček, 1975). Therefore, the distribution pattern of ChAT and neuropeptide immunoreactivities along the axon fibers could be due to the sequential delivery of the molecules to the axons.

The scarce coexistence of ChAT and peptide immunoreactivities in axon boutons and terminals com-

pared with colocalization of these immunoreactivities in SPN perikarya, as well as data from serial confocal images of ganglionic sections showing an independent location in distinct zones (probably varicosities) of immunolabels of ChAT- and NT-IR support our hypothesis that SPN synthesize ChAT and neuropeptides in their cell bodies and then successively route them by axonal transport to distinct axon boutons or terminals in sympathetic ganglia (Fig. 8). We are aware that, as we take an instant picture of the markers location due to the fixation procedure, this differential routing could be time dependent, i.e., the presence or absence of ChAT or peptide-IR could change in one moment, but the physiological implications are still valid.

The proposal that transmitters are segregated to distinct axonal processes of the same neuron challenges the current interpretation of Dale's principle that "the same mix of neurotransmitters must be found in all axonal branches of a neuron" (Dale, 1935; Eccles, 1976; Marder, 1999; Strata and Harvey, 1999; also see review by Whittaker, 1984). Other reports also confront this principle; for example, the segregation of transmitters to different axonal processes occurs in neurons of invertebrates (Blitz and Nusbbaum, 1999; Fisher et al., 1988; Sossin et al., 1990), and chemically distinct axon terminals originating from the same dopaminergic neuron have been found in the rat midbrain (Hattori et al., 1991). In the same way, it has been demonstrated in an elegant study, using double immunogold labeling combined with

double in situ hybridization, differential routing of coexpressed galanin and vasopressin to dendrites and axon processes in rat hypothalamic magnocellular neurons (Landry et al., 2003).

This segregation of messengers in nerve processes could be transitory, varying in response to synaptic environmental signals. Indeed, it has been demonstrated that sympathetic neurons in culture switch their transmitter content, or the release transmitter, due to the influence of diverse factors (Asmus et al., 2000; Guidry and Landis, 1998). Actually, these modifications in transmitters can be evoked by neurotrophic factors in just hours (Yang et al., 2002). However, these studies are limited, as they were performed in culture. Studies that demonstrate the ability of presynaptic terminals to regulate their transmitter content in vivo are required.

Finally, the localization of transmitters and cotransmitters in distinct axon boutons in sympathetic ganglia lead us to suggest that sympathetic synaptic cotransmission can occur by the concurrent release of transmitters and cotransmitters from distinct presynaptic boutons of the same or distinct neurons; once released, these mediators acting on the same target cell lead to changes in postjunctional activity. This is contrary to the generally accepted idea that most neurons coexpress and corelease two or more mediators from their axon boutons and terminals (Burnstock, 2004; Kupfermann, 1991; Merighi, 2002). The convergence of preganglionic fibers containing different peptides on ganglionic cells (Gibbins, 1992; Jiménez et al., 2002; Murphy et al., 1998) supports our proposal of concurrent release.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Luis Miguel de la Cruz, Elio Vega, and Hugo Álvarez for help in 3-D reconstruction, Pedro Medina for technical support, and Giselle Morgado for her artwork in Figure 8.

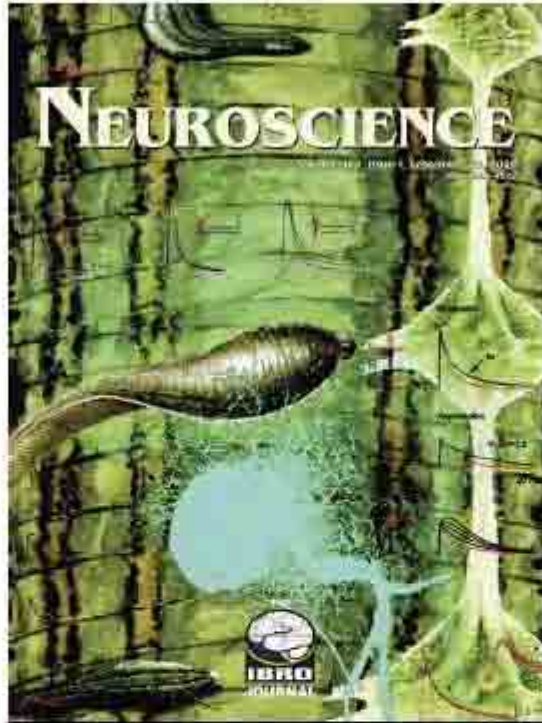
REFERENCES

- Asmus SE, Parsons S, Landis SC. 2000. Developmental changes in the transmitter properties of sympathetic neurons that innervate the periosteum. *J Neurosci* 20:1495–1504.
- Baldwin C, Sasek CA, Zigmond RE. 1991. Evidence that some preganglionic sympathetic neurons in the rat contain vasoactive intestinal peptide- or peptide histidine isoleucine amide-like immunoreactivities. *Neuroscience* 40:175–184.
- Benarroch EE. 1994. Neuropeptides in the sympathetic system: Presence, plasticity, modulation, and implications. *Ann Neurol* 36:6–13.
- Blitz DM, Nusbaum MP. 1999. Distinct functions for cotransmitters mediating motor pattern selection. *J Neurosci* 19:6774–6783.
- Burnstock G. 1976. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1:239–248.
- Burnstock G. 2004. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* 4:47–52.
- Chanthaphavong RS, Murphy SM, Anderson CR. 2003. Chemical coding of sympathetic neurons controlling the tarsal muscle of the rat. *Auton Neurosci: Basic Clin* 105:77–89.
- Colombo-Benkmann M, Heym C, Schemann M. 1995. Preganglionic sympathetic neurons, innervating the guinea pig adrenal medulla, immunohistochemically contain choline acetyltransferase and also leu-enkephalin. *Neurosci Lett* 190:155–158.
- Dale H. 1935. Pharmacology and nerve endings. *Proc Roy Soc Med* 28:319–332.
- Eccles JC. 1976. From electrical to chemical transmission in the central nervous system. *Notes Record Roy Soc Lond* 30:219–230.
- Elfvin LG, Lindh B, Hökfelt T. 1993. The chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia. *Annu Rev Neurosci* 16:471–507.
- Fisher JM, Sossin W, Newcromb R, Scheller RH. 1988. Multiple neuropeptides derived from a common precursor are differentially packaged and transported. *Cell* 54:813–822.
- Geffard M, McRae-Degueurce A, Souan ML. 1985a. Immunocytochemical detection of acetylcholine in the rat central nervous system. *Science* 229:77–79.
- Geffard M, Vieillemarange J, Heinrich-Rock AM, Duris P. 1985b. Anti-acetylcholine antibodies and first immunocytochemical application in insect brain. *Neurosci Lett* 57:1–6.
- Gibbins IL. 1992. Vasoconstrictor, vasodilator and pilomotor pathways in sympathetic ganglia of guinea-pigs. *Neuroscience* 47:657–672.
- Guidry G, Landis SC. 1998. Target-dependent development of the vesicular acetylcholine transporter in rodent sweat gland innervation. *Dev Biol* 199:175–184.
- Hattori T, Takada M, Moriizumi T, Van Der Kooy D. 1991. Single dopaminergic nigrostriatal neurons form two chemically distinct synaptic types: Possible transmitter segregation within neurons. *J Comp Neurol* 309:391–401.
- Hirokawa N. 1997. The mechanisms of fast and slow transport in neurons: Identification and characterization of the new kinesin superfamily motors. *Curr Opin Neurobiol* 7:605–614.
- Jiménez B, Mora-Valladares E, Zetina ME, Morales MA. 2002. Occurrence, co-occurrence and topographic distribution of choline acetyltransferase, met-enkephalin and neurotensin in the stellate ganglion of the cat. *Synapse* 43:163–174.
- Kondo H, Kuramoto H, Wainer BH, Yanaihara N. 1985. Evidence for the coexistence of acetylcholine and enkephalin in the sympathetic preganglionic neurons of rats. *Brain Res* 335:309–314.
- Krukoff T. 1987. Coexistence of neuropeptides in sympathetic preganglionic neurons of the cat. *Peptides* 8:109–112.
- Krukoff T, Ciriello J, Calaresu F. 1985. Segmental distribution of peptide-like immunoreactivity in cell bodies of the thoracolumbar sympathetic nuclei of the cat. *J Comp Neurol* 240:90–102.
- Kupfermann I. 1991. Functional studies of cotransmission. *Physiol Rev* 71:683–732.
- LaMotte CC, DeLanerolle NC. 1986. VIP terminals, axons, and neurons: Distribution throughout the length of monkey and cat spinal cord. *J Comp Neurol* 249:133–145.
- Landry M, Vila-Porcile E, Hökfelt T, Calas A. 2003. Differential routing of coexisting neuropeptides in vasopressin neurons. *Eur J Neurosci* 17:579–589.
- Lindh B, Staines W, Hökfelt T, Terenius L, Salvaterra P. 1986. Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea pig autonomic ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5316–5320.
- Marder E. 1999. Neural signalling: Does colocalization imply cotransmission? *Curr Biol* 9:809–811.
- Merighi A. 2002. Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 66:161–190.
- Morales MA, Holmberg K, Xu Z, Cozzari C, Hartman B, Emson P, Goldstein M, Elfvin L, Hökfelt T. 1995. Localization of choline acetyltransferase in rat peripheral sympathetic neurons and its coexistence with nitric oxide synthase and neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11819–11823.
- Morales MA, Sámano C, Zetina ME. 2003. Segregation of choline acetyltransferase, and neuropeptides in separate axonal fibers within sympathetic preganglionic neurons of the cat. Sixth Congress of the International Brain Research Organization Abstracts, Prague, Czech Republic.
- Morales MA, Hancock JC, Hoover DB. 2004. Neurochemical heterogeneity in sympathetic ganglia and its implications for cardiovascular regulation. In: Dun NJ, Machado BH, Pilowsky PM, editors. *Neural mechanisms of cardiovascular regulation*. Boston: Kluwer. p 303–333.
- Morris JL, Gibbins I. 1992. Co-transmission and neuromodulation. In: Burnstock G, Hoyle C, editors. *Autonomic neuroeffector mechanisms*. Philadelphia: Harwood Academic. p 33–119.
- Murphy SM, Matthew SE, Rodgers HF, Lituri DT, Gibbins IL. 1998. Synaptic organization of neuropeptide-containing preganglionic boutons in lumbar sympathetic ganglia of guinea pigs. *J Comp Neurol* 398:551–567.
- Reinecke M, Forssmann WG, Thieckotter G, Triepel J. 1983. Localization of neurotensin-immunoreactivity in the spinal cord and peripheral nervous system of the guinea pig. *Neurosci Lett* 37:37–42.

- Sámano C, Zetina ME, Morales MA. 2002. Different patterns of co-storage of acetylcholine and peptides in preganglionic sympathetic neurons. Presented at the 32nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Orlando, FL.
- Sha D, Jin H, Kopke RD, Wu JY. 2004. Choline acetyltransferase: Regulation and coupling with protein kinase and vesicular acetylcholine transporter on synaptic vesicles. *Neurochem Res* 29:199–207.
- Sossin WS, Sweet-Cordero A, Scheller RH. 1990. Dale's hypothesis revisited: Differential neuropeptides derived from a common prohormone are targeted to different processes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4845–4848.
- Strata P, Harvey R. 1999. Dale's principle. *Brain Res Bull* 50:349–350.
- Tucek S. 1975. Transport of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in the central stump and isolated segments of a peripheral nerve. *Brain Res* 86:259–270.
- Whittaker VP. 1984. What is Dale's principle? In: Chan-Palay V, Palay SL, editors. Coexistence of neuroactive substances in neurons. New York: Wiley. p 137–140.
- Yamamoto K, Senba E, Matsunaga T, Tohyama M. 1989. Calcitonin gene-related peptide containing sympathetic preganglionic and sensory neurons projecting to the superior cervical ganglion of the rat. *Brain Res* 487:158–164.
- Yang B, Slonimsky JD, Birren SJ. 2002. A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nat Neurosci* 5:539–545.

2. **Artículo publicado**, Sámano et al, 2009 (Neuroscience, 163(1) 29:180-189)

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

SEGREGATION OF MET-ENKEPHALIN FROM VESICULAR ACETYLCHOLINE TRANSPORTER AND CHOLINE ACETYLTRANSFERASE IN SYMPATHETIC PREGANGLIONIC VARICOSITIES MOSTLY LACKING SYNAPTOPHYSIN AND SYNAPTOTAGMIN

C. SÁMANO, M. E. ZETINA, F. CIFUENTES
AND M. A. MORALES*

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 3er Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, México

Abstract—Sympathetic preganglionic neurons (SPN) coexpress the acetylcholine (ACh)-synthesizing enzyme choline acetyltransferase and different peptides in their cell bodies, but can express them independently in separate varicosities, indicating that SPN segregate transmitters to different synapses. Consequently, there are populations of preganglionic varicosities (peptidergic and noncholinergic) that store peptides but not ACh. We studied in the cell bodies and axon processes of the rat SPN the expression and the proportional coexpression of the vesicular ACh transporter-like immunoreactivity (VAcHT), a specific marker of cholinergic synaptic vesicles or ChAT-like immunoreactivity (ChAT), and the peptide methionine enkephalin-like immunoreactivity (mENK), and confirmed the presence of a population of SPN peptidergic, noncholinergic varicosities. We characterized these varicosities by exploring the occurrence of synaptophysin-like immunoreactivity (Syn), a marker of small clear vesicles, and synaptotagmin-like immunoreactivity (Syt), a preferential marker of large dense core vesicles. We found that (i) VAcHT and mENK, like ChAT–mENK, were coexpressed in only 59% of the mENK-containing varicosities, although they colocalized in the SPN cell bodies; and (ii) almost 60% of the population of mENK-containing varicosities did not express Syn or Syt, and over 80% of the mENK-containing varicosities negative for VAcHT also lacked Syn. These data prove that SPN segregate mENK from VAcHT and ChAT, and show that most of the subset of mENKergic varicosities negative for VAcHT also does not express Syn, suggesting the presence of a different vesicular pattern in these sympathetic preganglionic varicosities. © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: transmitters, cholinergic synapse, peptides, co-transmission.

*Corresponding author. Tel: +5255-5622-8961; fax: +5255-5622-9198. E-mail address: mamm@biomedicas.unam.mx (M. A. Morales).

Abbreviations: ACh, acetylcholine; ChAT, choline acetyltransferase-like immunoreactivity; FITC, fluorescein isothiocyanate; LDCV, large dense core vesicles; mENK, methionine enkephalin-like immunoreactivity; PBS, phosphate-buffered saline; SCG, superior cervical ganglia; scv, small clear vesicles; SPN, sympathetic preganglionic neurons; Syn, synaptophysin-like immunoreactivity; Syt, synaptotagmin-like immunoreactivity; TxR, Texas Red; VAcHT, vesicular acetylcholine transporter-like immunoreactivity.

0306-4522/09 \$ - see front matter © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2009.06.010

In the sympathetic efferent pathways, the axons of the preganglionic neurons, whose cell bodies lie on the intermediolateral nuclei of the spinal cord, project through the preganglionic nerves to the sympathetic ganglia, where they synapse with the postganglionic neurons (Elfvén et al., 1993; Baluk, 1995). This ganglionic synapse is identified as cholinergic because the main mediator involved in its chemical transmission is acetylcholine (ACh; immunohistochemically identified by antibodies directed against its synthesizing enzyme, choline acetyltransferase). Once the cholinergic nature of the sympathetic preganglionic neurons (SPN) was established, the presence of other putative chemical mediators, such as neuropeptides, was also detected in these neurons. Consequently, the concept of synaptic cotransmission was coined and accepted as a general rule (Morris and Gibbins, 1992; Elfvén et al., 1993; Burnstock, 2004; Morales et al., 2004). This concept means that all SPN varicosities co-store and co-release ACh and different neuropeptides, the ACh transmits the main signal from preganglionic to ganglionic neurons, whereas the neuropeptides modulate this signal. The idea of co-storage of synaptic mediators, although not fully demonstrated, prevailed for a long time, until accumulating evidence revealed that some peptides, such as enkephalin, occur in boutons and terminals devoid of choline acetyltransferase-like immunoreactivity (ChAT; Lindh et al., 1986; Morales et al., 1995; Jiménez et al., 2002), nevertheless, these peptides were found to colocalize with ChAT in preganglionic cell bodies and in some varicosities (Kondo et al., 1985; Lindh et al., 1986; Colombo-Benkmann et al., 1995; Morales et al., 1995; Jiménez et al., 2002). Later, we provided further evidence of the independent localization of transmitters in separate axonal processes of SPN and confirmed the differences in ChAT–peptide colocalization in cell bodies, axons, and varicosities, thus demonstrating the segregation of transmitters and cotransmitters in the SPN (Sámano et al., 2006).

The segregation of peptides from ACh in SPN implies the presence of peptide-containing varicosities that do not store ACh (at detectable levels). Because peptides are stored in large dense core vesicles (LDCV; Boarder, 1989; Merighi, 2002), it is possible that (i) these peptidergic noncholinergic varicosities store peptides in LDCV, whereas their small clear vesicles (scv) contain other classic transmitters (see Discussion); (ii) these varicosities eventually lack scv; or less probably, that (iii) varicosities

store nonvesicular peptides; or (iv) scv also store peptides. To address this issue, we characterized the preganglionic population of peptide-containing varicosities, both those coexpressing and those not coexpressing the cholinergic markers vesicular acetylcholine transporter-like immunoreactivity (VAcHT) and ChAT, by immunolabeling two types of synaptic vesicle proteins: synaptophysin-like immunoreactivity (Syn), considered to be almost specific for scv (Wiedenmann and Franke, 1985; Navone et al., 1989; Walch-Solimena et al., 1993), and synaptotagmin-like immunoreactivity (Syt), which is detected preferentially in LDCV (Walch-Solimena et al., 1993; Winkler, 1997; Berg et al., 2000). We found that 60% of the varicosities immunoreactive for the peptide methionine enkephalin-like immunoreactivity (mENK) did not express Syn or Syt. Moreover, most of the mENK-containing varicosities negative for VAcHT also lacked the synaptic vesicle protein Syn. Preliminary accounts of these findings have been published in abstract form (Sámano et al., 2007).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Experiments were carried out on male Wistar rats (200–300 g), which were treated in accordance with the ethical guidelines for the care and use of laboratory animals of the National Academy of Sciences of the United States and approved by our Bioethical Committee. We minimized the number of animals used and their possible suffering. The rats were anesthetized with xylazine (10 mg/kg i.m.) and ketamine (90 mg/kg i.p.). To decentralize the ganglion, the sympathetic thoracic trunk was exposed and cut 3–5 mm caudal to the ganglion. After the surgical procedure, the animals were given postoperative care. To block the SPN axonal transport with colchicine, a catheter was inserted into the region of the atlanto-occipital junction, reaching the 6th–8th cervical spinal cord segments, and 10–16 µg colchicine (1 µg/µL in physiological saline solution) was slowly injected intrathecally. After seven days (decentralization) or two days (colchicine treatment), the rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (125 mg/kg i.p.) and transcardially perfused with 100 mL of ice cold phosphate-buffered saline (0.01 M PBS, pH 7.4) for 3 min, and then with 250 mL of ice-cold fixative solution (2% paraformaldehyde, 0.18%

picric acid in 0.1 M PBS, pH 7.4), 100 mL for 3 min and the remaining 150 for 40 min. The superior cervical ganglia (SCG) and a spinal cord segment (from C7 to T3) were dissected, postfixed overnight in the same fixative solution, and cryoprotected in sucrose solution (10%–30% w/v). Horizontal and transverse sections of the spinal cord and longitudinal sections of the SCG (14-µm thickness) were cut with a cryostat at –20 °C, recovered on Superfrost plus slides (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), and processed at room temperature in a humid atmosphere with a routine procedure for double or triple immunohistochemical staining. The tissue sections were preincubated for 2 h with 5% bovine serum albumin and then incubated overnight with primary antibodies directed against the following antigens ChAT, VAcHT, mENK, Syn, or Syt (Table 1). The tissue sections were rinsed twice for 10 min each in PBS–Triton X-100 (0.1 M PBS, 0.3% Triton X-100), and then incubated for 2 h with the appropriate secondary antibody. For double labeling to localize ChAT and VAcHT, we used a biotinylated antibody (anti-goat IgG) followed by Texas Red (TxR)–conjugated avidin, and secondary antibodies coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC) to reveal mENK and the vesicular proteins. For triple immunostaining, we used FITC-, TxR-, and Cy5-conjugated antibodies to label mENK, Syn, and VAcHT, respectively (Table 1). To prevent cross-reactive false positive artifacts in the double or triple labeling experiments, immunostaining was performed sequentially, usually starting with anti-ChAT or anti-VAcHT antibody, followed by the remaining markers. In both tissues, spinal cord and SCG as a control, previous to the immunostaining procedure, the primary antibodies were preadsorbed overnight at room temperature with a 10-fold molar excess of their corresponding control antigens (0.1 µM for ChAT [Chemicon, Temecula, CA, USA] and 1 µM for the rest [mENK, Sigma, St. Louis, MO, USA; Syn and Syt, Abcam, Cambridge, MA, USA]); as another control, some tissue sections were processed with all the incubation steps but the primary antibodies were omitted. Finally, sections were coverslipped with a fluorescence mounting medium (Vectashield, Vector, Burlingame, CA, USA) and examined with an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E600; Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA; or DSU-equipped Olympus BX51WI; Olympus America Inc., Center Valley, PA, USA), equipped with the appropriate filters for FITC, TxR, and Cy5. Selected sections with double labeling or triple immunostaining were further analyzed with a confocal LSM 5 Pascal Zeiss microscope (Carl Zeiss de México, DF, México) equipped with an argon/krypton laser.

Table 1. Antibodies used for immunofluorescence labeling

Antiserum	Type of antibody	Coupled to	Dilution	Origin
Primary				
VAcHT (rat)	Goat polyclonal	—	1:100	Promega Corp, Madison, WI, USA
ChAT (human)	Goat polyclonal	—	1:200	Millipore, Chemicon Billerica, MA, USA
m-Enk (bovine)	Rabbit polyclonal	—	1:100	Millipore, Chemicon
Synaptophysin (human)	Rabbit polyclonal	—	1:200	Dako Cytomation, Denmark
Synaptophysin (synthetic)	Mouse monoclonal	—	1:50	Dako Cytomation
Synaptotagmin (synthetic)	Mouse monoclonal	—	1:50	Millipore, Chemicon
Secondary				
α Goat IgG biotinylated	Horse	Avidin DCS ^a -TxR	1:100	Vector, Burlingame, CA, USA
			1:200	
α Goat IgG biotinylated	Horse	Streptavidin Cy5	1:200	Zymed, San Francisco, CA, USA
α Rabbit IgG	Rat	FITC	1:200	Zymed
α Rabbit IgG	Goat	TxR	1:200	Vector
α Mouse IgG	Goat	FITC	1:200	Zymed
α Mouse IgG	Horse	TxR	1:200	Vector

^a Avidin DCS: avidin distinct cell sorter.

Sampling, assessing colocalization, and statistics

Each ganglion was longitudinally sectioned throughout the entire length of its mediolateral axis (ca. 800 μm), to produce 40–50 slices. We sampled the tissue by collecting at least five slices at three depths (140–210, 350–420, and 560–630 μm from the edge of the ganglion) and sorted the slices onto different slides. In each section, we selected a slice at random and explored its whole area by scanning and imaging it with a 20 \times (0.5 NA) or 40 \times (1.15 NA) magnification objective [or sampling two places at random in each region with a 60 \times (1.2 NA) objective] using the motorized stage of a DSU-equipped Olympus BX51WI microscope, controlled by StereoInvestigator software (MicroBrightField, Inc., Williston, VT, USA), this confocal-like microscope is equipped with a spinning disk device that produces optical slices of which thicknesses are 3.5, 0.72 and 0.63 μm for 20 \times , 40 \times , and 60 \times objectives, respectively. After virtual slice reconstruction, using the Metamorph image analysis system (v. 7.5.6; Universal Imaging Corporation, Molecular Devices, Downingtown, PA, USA), we remove out of focus blur by means of deconvolution functions, reducing the thickness of the optical sections; and then we identify the specific immunofluorescence labels that were more intense than the background level (i.e. $>\text{mean} \pm 2$ standard deviations). The area occupied by the fibers immunopositive for ChAT, VAcHT, Syn, Syt, or mENK was expressed as a percentage of the whole section area. The colocalization of two labels is presented as the ratio of the percentage of fibers coexpressing the two labels relative to the percentage of fibers expressing one of them. Thus, a ratio of 1 corresponds to complete colocalization, whereas a ratio of 0 represents a completely independent localization. We used six animals for each of the ChAT–mENK, VAcHT–mENK, VAcHT–Syn, mENK–Syn, and mENK–Syt label pairs, and four animals for triple immunostaining for VAcHT–Syn–mENK and double immunostaining for Syn–Syt.

To quantify the SPN cell bodies expressing ChAT or VAcHT and mENK in the spinal cord, we sectioned it transversally at the levels of the exiting nerve roots or longitudinally, recovering all the tissue slices. We counted the numbers of cell bodies positive for ChAT, VAcHT, or mENK or for two molecules (colocalization) in the intermediolateral nuclei.

To investigate whether the co-occurrence of transmitters varied depending on the postganglionic target, we explored the regional distribution of the markers. Each ganglionic section was divided into four regions of equal area: (i) rostral, associated with the exit of the external carotid postganglionic nerve, (ii) rostrome-dial, and (iii) caudomedial, both near the exit of the internal carotid postganglionic nerve, and (iv) caudal, including the region near the preganglionic nerve entrance. We quantified the percentage of cotransmitter coexpression, as described above.

Data are expressed as means \pm SEM. The significance of differences between the means was evaluated either with an independent Student's *t*-test or, in the case of the distribution of co-localization along the ganglionic regions, with an independent one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test. The significance level was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Almost all SPN mENK-immunopositive cell bodies coexpressed VAcHT or ChAT

After treatment with colchicine to block axonal transport, VAcHT- or ChAT-immunopositive cell bodies appeared in the intermediate lateral horn of the spinal cord. The appearance and size of these neurons (clusters of 6.7 ± 0.4 cells, round to fusiform in shape, and 30–40 μm in diameter, $n=6$) indicate that they correspond to SPN. Most of these neurons ($>80\%$) were detected in the intermediolat-

eral nucleus pars principalis. Some of these cholinergic cell bodies also expressed mENK ($32.8 \pm 7.1\%$). Conversely, practically all the cell bodies immunopositive for mENK ($97.0 \pm 3.2\%$) coexpressed either VAcHT or ChAT (Fig. 1). A few scattered neurons, generally located outside the autonomic nuclei, were positive for mENK but not for VAcHT or ChAT. Controls without primary antibody or with preadsorbed primary antibody were negative.

Occurrence of VAcHT and ChAT within the SCG: ChAT in axon fibers and presynaptic boutons and VAcHT only in presynaptic boutons

Both cholinergic markers, VAcHT and ChAT, were detected in the preganglionic fibers of the rat SCG. As expected, because of its cytoplasmic and membrane-bound distribution, ChAT appeared in axon fibers (either smooth or varicose) and presynaptic boutons (Fig. 2c), whereas VAcHT immunostaining was detected as punctate label mainly in presynaptic boutons (Fig. 2a). Despite their different cellular locations, both markers labeled the same number of axonal processes (17.9 \pm 1.3% of the total area of the ganglia for VAcHT and 18.4 \pm 0.3% for ChAT, $n=6$, $P=0.7$; Fig. 2e). The regional distributions of both cholinergic markers were heterogeneous, with a higher presence in the rostral region (Fig. 2f). Ganglionic denervation, achieved by fully sectioning the preganglionic cervical trunk, abolished over 95% of the ChAT and all the VAcHT-immunopositive boutons, indicating their preganglionic origin (Fig. 3b, c).

With double immunostaining for VAcHT and Syn, a constitutive scv membrane protein, punctate label Syn was broadly dispersed in the entire ganglia, staining 19.9 \pm 1.4% of the ganglion surface ($n=6$; Fig. 4b). Almost all VAcHT-containing varicosities (95.7 \pm 4.2%) coexpressed Syn, whereas 79.6 \pm 4.4% of the Syn-positive varicosities costained for VAcHT (Fig. 4c). Like ChAT and VAcHT, Syn showed an uneven distribution along the ganglia, with a greater presence in the rostral region (Fig. 2f).

Nearly half the mENK-containing preganglionic axon fibers and presynaptic boutons lacked VAcHT or ChAT

Immunostaining for mENK showed a network of varicose fibers lying in the neuropil around the cell bodies of the ganglionic neurons (Fig. 2b, d). Immunopositive fibers showed a rostrocaudal gradient (Fig. 2f). As expected, the mENK-positive fibers represented only a small proportion of the ganglionic area (1.4 \pm 0.2%; $n=6$; Fig. 2e), which is roughly 10 times less than the area of the axon fibers immunopositive for the other markers (VAcHT, ChAT, and Syn).

Double immunostaining for mENK and VAcHT or ChAT showed independent locations for each molecule in separate axon fibers and presynaptic boutons. The 40.0 \pm 4.2% of the mENK-positive fibers did not express VAcHT or ChAT ($n=6$; Fig. 2a–d, g, h). We are confident of the preganglionic origin of these mENK-positive fibers, because the transection of the preganglionic nerve re-

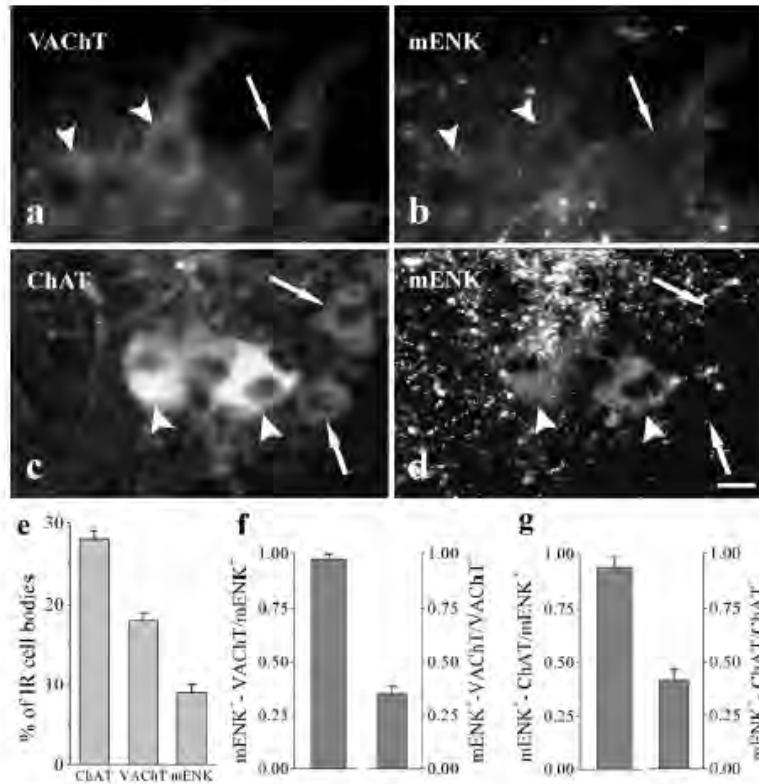


Fig. 1. Practically all mENK-containing cell bodies of SPN coexpress either VAcHT or ChAT. (a–d) Micrographs of the double immunofluorescent detection of VAcHT–mENK (a, b) and ChAT–mENK (c, d) in the intermediolateral nuclei of the spinal cord, two days after the intrathecal application of colchicine. All mENK-positive somata coexpressed ChAT or VAcHT (arrowheads). There are also some cholinergic somata (VAcHT- or ChAT-positive) that were negative for mENK (thin arrows). Scale bar=10 μ m for (a, b) and 20 μ m for (c, d). (e) Graph of the proportion of cell bodies immunostained for each of the three examined markers. (f, g) Graphs showing the ratio of the colocalization of mENK and VAcHT/total cell bodies positive for mENK (left ordinate; f) or for VAcHT (right ordinate; f), and the colocalization of mENK and ChAT/total cell bodies positive for mENK (left ordinate; g) or for ChAT (right ordinate; g). It is clear that almost 100% of the mENK-containing cell bodies coexpress either VAcHT or ChAT.

moved nearly the 99.5% of the entire population of labeled fibers (Fig. 3d).

Coexistence of mENK with VAcHT or ChAT varied negligibly along the ganglia

The coexistence of mENK-positive fibers with VAcHT- or ChAT-positive fibers varied negligibly along the ganglia except for mENK–ChAT (Fig. 5), these markers were less colocalized in the caudomedial region or in the caudal region than in the rostral region ($42.5 \pm 3.1\%$ vs. $55.9 \pm 4.6\%$ for ChAT–mENK/mENK and $3.7 \pm 0.6\%$ vs. $6.8 \pm 1.4\%$ for ChAT–mENK/ChAT; $n=6$; $P=0.03$ and 0.04 ; respectively). This reduction in coexpression may be attributable in part to the small number of ChAT-positive fibers detected in those regions.

The majority of mENK boutons did not express markers for synaptic vesicle proteins

We characterized the vesicle pattern of the mENK-containing varicosities by immunodetecting two synaptic vesicle markers, Syn, a vesicular protein specific for scv, and Syt, a presumed specific marker for LDCV. We found that the majority of the mENK-positive varicosities did not express Syn or Syt ($67.1 \pm 5.6\%$ vs. $57.7 \pm 4.3\%$, respectively; $n=6$; $P=0.7$; Fig. 6). Previously, we explored the proposed specificity of Syt in immunostaining LDCV, we examined the level of co-expression of Syn and Syt, based on the rationale that if Syt immunostaining does not distinguish scv and LDCV, we should expect complete colocalization of Syt in all Syn-immunostained varicosities. Any independent immunolabeling of Syn would indicate that Syt immunolabels LDCV with some degree of specificity. We found that $56.2 \pm 4.8\%$ of Syn-ex-

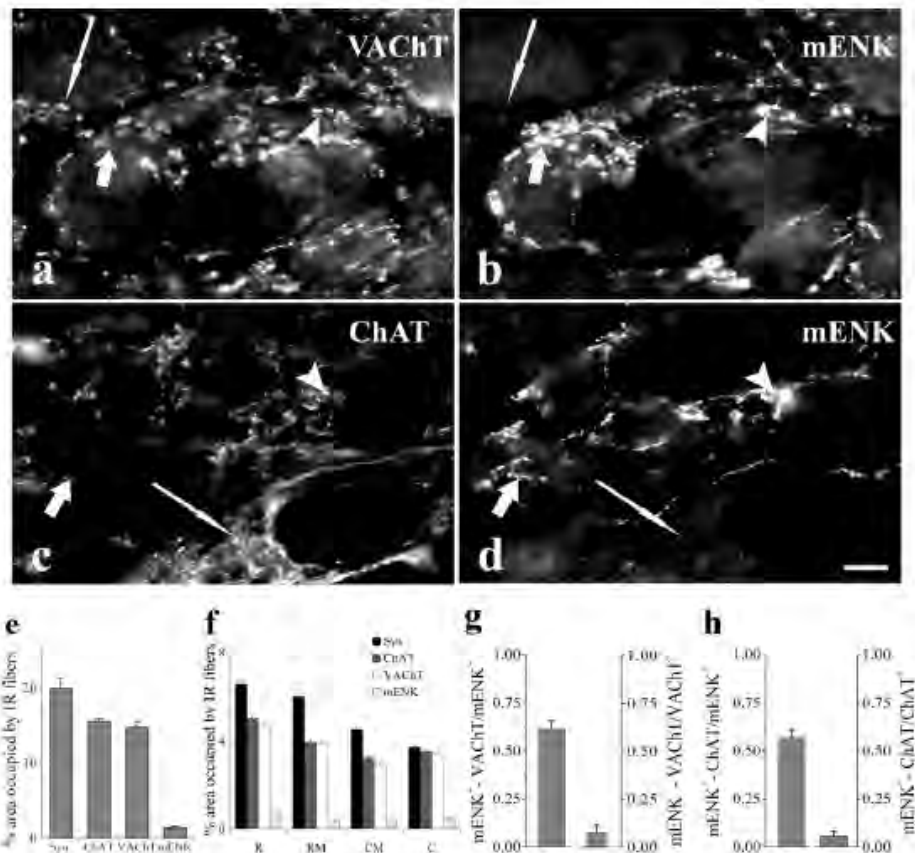


Fig. 2. Around 40% of the mENK-containing varicosities of SPN do not express VAcHT or ChAT. (a–d) Micrographs of the double immunofluorescent detection of VAcHT–mENK (a, b) and ChAT–mENK (c, d) in sections from the SCG. There are several mENK-containing varicosities negative for VAcHT or ChAT (arrows). Varicosities coexpressing both markers (arrowheads) and cholinergic varicosities negative for mENK (thin arrows) are also shown. Scale bar—20 μ m. (e, f) Graphs of the proportion of fibers immunoreactive for each of the four markers examined in the whole ganglion section (e) and in each of the four ganglionic regions examined (f). (g, h) Graphs showing the ratio of fibers coexpressing mENK and VAcHT/total fibers expressing mENK (left ordinate; g) or VAcHT (right ordinate; g), or the ratio of fibers coexpressing mENK and ChAT/total fibers expressing mENK (left ordinate; h) or ChAT (right ordinate; h). We found that 38% and 39% of the mENK-containing varicosities did not express VAcHT and ChAT, respectively.

pressing varicosities were negative for Syt ($n=4$; Fig. 7), supporting the proposal that Syt preferentially immunolabels LDCV. We also found that $34.0 \pm 5.3\%$ of Syt-positive varicosities were devoid of Syn (Fig. 7). This proportion probably corresponds to varicosities containing only LDCV.

Finally, in a triple immunostaining experiment for mENK, Syn, and VAcHT, we found that the subset of mENKergic noncholinergic varicosities (this subset was obtained by subtracting those varicosities coexpressing VAcHT and mENK from the full population of mENK positive varicosities) showed less coexpression with Syn than did the whole population of mENK-containing varicosities ($15.5 \pm 1.9\%$ vs. $40.0 \pm 3.3\%$, respectively; $n=4$; $P=0.001$; Fig. 8). Hence, 84.5% of the mENKergic noncholinergic

varicosities did not express Syn, compared with 60% of the whole population of mENK-containing varicosities. Therefore, the mENK-containing varicosities that did not express VAcHT probably also did not express the scv synaptic marker.

DISCUSSION

In this study, we investigated the colocalization of mENK and ACh in rat preganglionic sympathetic neurons. We found that mENK and the cholinergic markers, VAcHT or ChAT (the former a presumed more specific cholinergic marker), always colocalized in the SPN cell bodies but in only 60% of the preganglionic fibers. This indicates that a

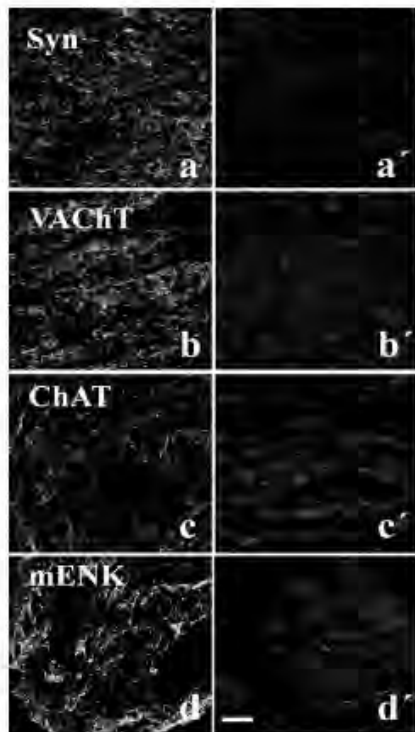


Fig. 3. Practically all varicose fibers immunostained for Syn, VACHT, ChAT, and mENK have a preganglionic origin. Denervation of the ganglia by sectioning the sympathetic preganglionic trunk abolished the immunostaining. Micrographs of the immunofluorescent detection of Syn (a, a'), VACHT (b, b'), ChAT (c, c'), and mENK (d, d') in sections from intact ganglia (a–d), and from denervated ganglia (a'–d'). Scale bar=50 μ m.

set of mENK-positive axonal processes (fibers and boutons) is noncholinergic. Most of the mENK-containing varicosities did not express synaptic vesicle membrane proteins such as Syn, an scv marker, or Syt, a preferential LDCV marker. Interestingly, the mENKergic varicosities that did not express VACHT also did not express Syn. These results provide new evidence of the segregation of neurotransmitters in the SPN, and suggest that the population of mENKergic noncholinergic varicosities may not have the usual vesicular synaptic pattern of preganglionic varicosities.

The data presented here agree with previous unrelated results that showed a colocalization of ENK and ChAT in the cell bodies of SPN (Kondo et al., 1985; Colombo-Benkmann et al., 1995) opposing the independent localization of these markers in the axon processes (Lindh et al., 1986; Morales et al., 1995; Jiménez et al., 2002; Chanthaphavong et al., 2003). These data also agree with our previous results showing that ChAT and several peptides, including mENK, do not colocalize completely in the axon

fibers of SPN in the cat (Sámano et al., 2006). All these data support our hypothesis that the classic transmitters and cotransmitters are segregated in sympathetic preganglionic fibers. There was no difference in the proportion of varicosities positive for VACHT or ChAT, indicating that both cholinergic markers are equivalent, thus validating the results of our previous report (Sámano et al., 2006).

It can be argued that the mENK-positive noncholinergic varicosities would correspond to: (i) projections of postganglionic sensory neurons or intraganglionic interneurons, or are derived from the vagus nerve, but none of these possibilities is likely because the sectioning of the preganglionic nerve removed near 100% of mENK-positive fibers; or (ii) projections of an atypical noncholinergic population of SPN, but this possibility is also rejected because almost all the mENK-positive cell bodies detected in the preganglionic nuclei of the spinal cord coexpress VACHT or ChAT; or finally, (iii) mENK positive label could be within a cholinergic bouton but distant to the cholinergic marker because of their different subcellular localization, insofar as VACHT is located in the scv, whereas ENK is stored in the LDCV (Chanthaphavong et al., 2003). However, this possibility would account only for independent localization separated less than the size of a bouton ($\sim 1 \mu$ m) and according to our results most of the mENK-positive labels were located at least 1μ m far from cholinergic staining.

Several reports have indicated that the neurotransmitters of invertebrate and mammalian neurons may be segregated to different synapses. In *Aplysia*, the bag cells process egg-laying prohormone into two sets of peptides, sorting them to distinct synaptic vesicles and segregating them to separate neuronal processes (Fisher et al., 1988;

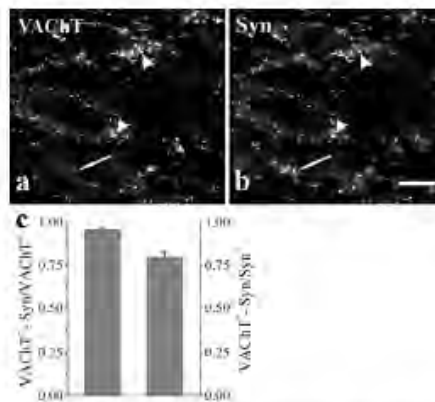


Fig. 4. Nearly 100% of the VACHT-containing varicosities coexpressed Syn. Micrographs of double immunofluorescent labeling for VACHT (a) and Syn (b) in sections from the SCG. Most of the VACHT-containing varicosities coexpressed Syn (arrowheads), whereas some Syn-positive varicosities did not express VACHT (thin arrows). Scale bar=25 μ m. (c) Graph showing the ratio of fibers coexpressing VACHT and Syn/total fibers positive for VACHT (left ordinate) or for Syn (right ordinate). We found that 95.7% of the VACHT-labeled varicosities were also positive for Syn.

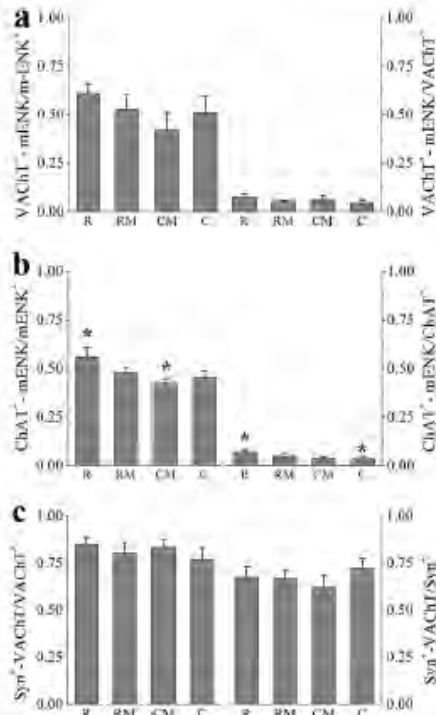


Fig. 5. Ganglionic caudomedial region shows less co-occurrence of ChAT and mENK. Topographic distributions of the relative coexpression of VAcHT–mENK (a), ChAT–mENK (b), and Syn–VAcHT (c) along the rostral (R), rostromedial (RM), caudomedial (CM), and caudal (C) ganglionic regions. The results are expressed as the ratio of fibers coexpressing either (a) VAcHT and mENK/total fibers expressing mENK (left ordinate) or expressing VAcHT (right ordinate); (b) ChAT and mENK/total fibers expressing mENK (left ordinate) or expressing ChAT (right ordinate); and (c) Syn and VAcHT/total fibers expressing VAcHT (left ordinate) or expressing Syn (right ordinate). We found that the caudomedial and the caudal region have less coexpression of ChAT and mENK (* $P < 0.05$).

Sossin et al., 1990; Chun et al., 1994), whereas in the stomatogastric nervous system of the Jonah crab (*Cancer borealis*), neurons release GABA and proctolin to different targets (Blitz and Nusbaum, 1999). Hattori et al. (1991) also reported that two chemically distinct axon terminals project from single dopaminergic nigrostriatal neurons in the rat striatum. Similarly, Rayport's (Sulzer et al., 1998; Joyce and Rayport, 2000; Sulzer and Rayport, 2000) laboratory has shown that dopaminergic neurons of the ventral tegmental area segregate dopamine and glutamate to separate varicosities on medium spiny neurons of the nucleus accumbens *in vivo* and in culture. Landry and co-workers (2003) have demonstrated differential routing of galanin and vasopressin to dendritic and axonal processes in rat hypothalamic magnocellular neurons (Landry et al., 2003). Nishimaru and colleagues (2005) found that mammalian spinal motoneurons corelease glutamate and ACh

in the central synapses, but only ACh in the neuromuscular junction. Based on these findings, they suggested that the transmitters are not colocalized in the same boutons but are segregated (Nishimaru et al., 2005). Recently, it has been shown by electron microscopy that mesencephalic neuron boutons independently express glutamate and tyrosine hydroxylase (Dal Bo et al., 2008; Descarries et al., 2008).

The lack of cholinergic markers in about 40% of mENK-containing preganglionic axonal fibers and boutons may be attributable to the presence of another classic transmitter in these neuronal processes, such as GABA (Kása et al., 1988; Wolf et al., 1989; Ito et al., 2007), glutamate (Morrison et al., 1989; Semba et al., 1991; Ito et al., 2005), dopamine (Heym et al., 1981), or 5-HT (Karhula et al., 1995). However, this is unlikely because the fibers containing classic transmitters other than ACh generally coexpress VAcHT (Ito et al., 2005, 2007) or they do not coexpress mENK (Párducz et al., 1992; Dobó et al., 1993). Furthermore, the lack of synaptic vesicle markers in this subset of preganglionic fibers makes the presence of classic transmitters more unlikely. We actually expected to observe the expression of Syt, because it occurs prefer-

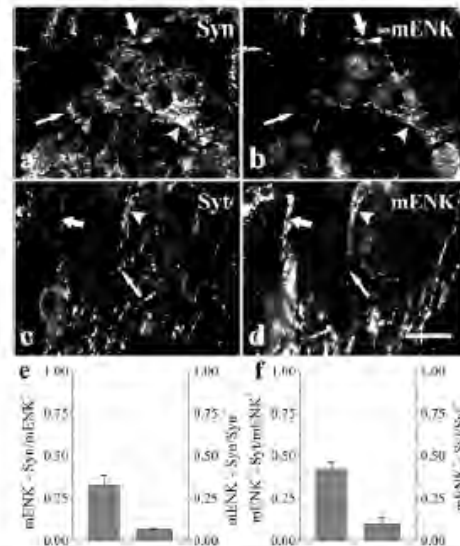


Fig. 6. A considerable subset of mENK-containing varicosities did not express the synaptic vesicle proteins. Micrographs of the double immunofluorescent detection of Syn–mENK (a, b) and Syt–mENK (c, d) show that there are mENK-containing varicosities negative for Syn or for Syt (arrows). There are also Syn- or Syt-positive varicosities not expressing mENK (thin arrows) and some varicosities coexpressing the synaptic vesicle markers and mENK (arrowheads). Scale bar=20 μ m. (e, f) Graphs showing the ratio of fibers coexpressing either: (e) mENK and Syn/total fibers positive for mENK (left ordinate) or for Syn (right ordinate); or (f) mENK and Syt/total fibers positive for mENK (left ordinate) or for Syt (right ordinate), indicating that $67.1 \pm 5.6\%$ of the mENK-containing varicosities did not express Syn and $57.7 \pm 4.3\%$ of those varicosities did not express Syt. The percentages of varicosities expressing both mENK and Syt or Syn were similar ($P = 0.7$).

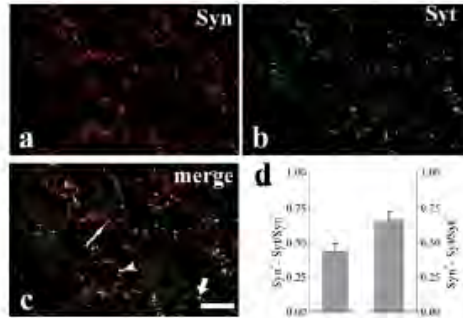


Fig. 7. Half the Syn-positive varicosities were not stained for Syt. Double immunostaining for Syn (a) and Syt (b). The merged image (c) shows the presence of several Syn-positive varicosities not labeled for Syt (red label, thin arrow) and some Syt-containing varicosities not expressing Syn (green label, arrow). The coexpression of both markers is also shown (yellow label, arrowhead). Scale bar = 25 μ m. The graph in (d) shows the ratio of fibers coexpressing Syn and Syt/total fibers positive for Syn (left ordinate) or for Syt (right ordinate), indicating that $56.2 \pm 4.8\%$ of the Syn-positive varicosities do not express Syt, whereas $34.0 \pm 5.3\%$ of the Syt-positive varicosities do not express Syn.

entially in LDCV, and because neuropeptides are stored in these vesicles (Bcarder, 1989; Merighi, 2002; Scalettar, 2006), but we found that near two thirds of mENKergic varicosities do not express Syt, at least at detectable levels. These results raise the possibility that this subset of mENK-containing varicosities has a different type of synaptic vesicles, such as the small dense core vesicles involved in synaptogenesis (Zhai et al., 2001; Sorra et al., 2006), which may store mENK but without the expression of the synaptic vesicle proteins studied here. Similar findings of peptide-containing varicosities with low or undetectable levels of ChAT, VACHT, and various synaptic vesicle proteins, including Syn and Syt, have been reported in the celiac ganglia (Gibbins et al., 2003). Further ultrastructural observations are required to clarify this matter. In these noncholinergic mENK-containing fibers, the peptide mENK may be a classic transmitter, as in other regions (Kow and Pfaff, 1988; Strand, 1999) or may retain its neuromodulator role in cholinergic transmission, while being released from separate boutons converging upon the same targets as ACh. The convergence of preganglionic nerves containing different transmitters on single ganglionic neurons has been reported elsewhere (Gibbins, 1992; Murphy et al., 1998; Jiménez et al., 2002).

According to the reported homogeneous distribution of ganglionic body cells along the ganglia (Bowers and Zigmond, 1979), the rostrocaudal distribution of ChAT-, VACHT-, and mENK-immunopositive fibers was unexpected and is probably related to the biochemical and functional heterogeneity of the ganglionic neurons (Furness et al., 1989; Wolff et al., 1989; Li and Horn, 2006). On the contrary, most of the explored co-occurrences have shown homogeneous distributions, except ChAT–mENK, which is less abundant in the caudomedial region than in the rostral region, suggesting that neurons in this region

are preferentially targeted by the subset of mENKergic varicosities lacking ChAT.

Considering that our study provides only an instantaneous image of the chemical mediator content of the presynaptic boutons, and given the vast capacity of sympathetic neurons to alter their expression of transmitters and co-transmitters *in vivo* and *in vitro* (Potter et al., 1986; Landis, 1988; Lindh and Hökfelt, 1990) it is possible that the separate expression of transmitters and cotransmitters

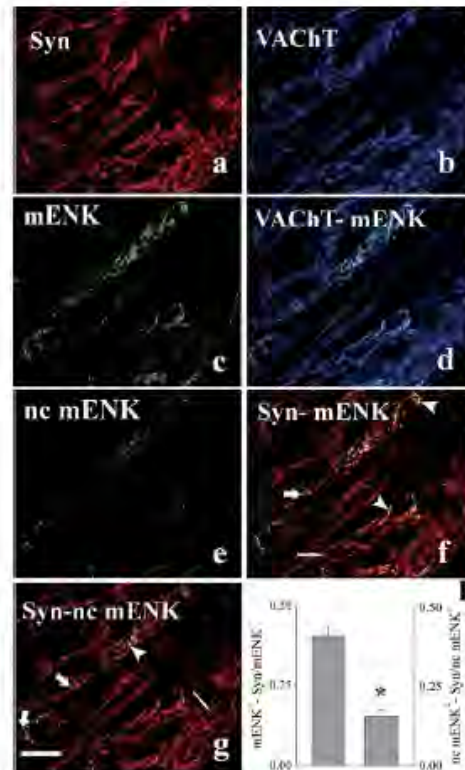


Fig. 8. Most of the mENK-containing varicosities negative for VACHT did not express Syn. Micrographs of triple immunostaining for Syn (a), VACHT (b), and mENK (c), and the merged image of VACHT/mENK (d). Subset of noncholinergic mENK varicosities (nc-mENK; e) obtained by subtracting those varicosities coexpressing VACHT and mENK (cyan labels in d) from the whole population of mENK-positive varicosities showed in (c). Merged images of Syn–mENK (f) and Syn–nc-mENK (g) varicosities show the presence of mENK or nc-mENK-positive varicosities coexpressing (yellow label, arrowhead) or not Syn (green label, arrows), Syn-positive varicosities not expressing mENK or nc-mENK (red label, thin arrows) are also shown. Scale bar = 50 μ m. (h) Graph of the ratio of fibers coexpressing mENK and Syn/total fibers positive for mENK (left ordinate) and the ratio of the nc-mENK fibers coexpressing Syn/total nc-mENK varicosities (right ordinate). The proportion of mENK-containing varicosities negative for VACHT that express Syn ($15.5 \pm 1.9\%$) was significantly smaller than the proportion of total mENK-containing varicosities ($40.0 \pm 3.3\%$; * $P = 0.001$).

in different varicosities is transient and varies according to synaptic functional requirements. The study of Birren and coworkers (Yang et al., 2002; Slonimsky et al., 2003), showing that neurotrophin can switch the phenotype of the projections of sympathetic cultured neurons from adrenergic to cholinergic, points in this direction. Therefore, we can infer that SPN react to the influence of diverse factors *in situ*, such as stress, autonomic diseases, or circulating neurotrophins, by altering the differential routing of synaptic mediators according to the functional requirements of the cell. Experiments exploring this possibility are currently under way in our laboratory.

Acknowledgments—The authors thank Pedro Medina for his technical support. C. Sámano is the recipient of a postgraduate scholarship from CONACYT, Mexico. Supported by: CONACYT (Mexico) grant 49807Q.

REFERENCES

- Baluk P (1995) Structure of autonomic ganglia. In: *Autonomic ganglia* (McLachlan E, ed), pp 13–71. Luxembourg: Harwood Academic Publishers/Luxembourg.
- Berg EA, Johnson RJ, Leeman SE, Boyd N, Kimerer L, Fine RE (2000) Isolation and characterization of substance P-containing dense core vesicles from rabbit optic nerve and termini. *J Neurosci Res* 62:830–839.
- Blitz DM, Nusbaum MP (1999) Distinct functions for cotransmitters mediating motor pattern selection. *J Neurosci* 19:6774–6783.
- Boarder MR (1989) Presynaptic aspects of cotransmission: relationship between vesicles and neurotransmitters. *J Neurochem* 53: 1–11.
- Bowers CW, Zigmond RE (1979) Localization of neurons in the rat superior cervical ganglion that project into different postganglionic trunks. *J Comp Neurol* 185:381–391.
- Burnstock G (2004) Co-transmission. *Curr Opin Pharmacol* 4:47–52.
- Chanthaphavong RS, Murphy SM, Anderson CR (2003) Chemical coding of sympathetic neurons controlling the tarsal muscle of the rat. *Auton Neurosci Basic Clin* 105:77–89.
- Chun JY, Korner J, Kreiner T, Scheller RH, Axel R (1994) The function and differential sorting of a family of aplysia prohormone processing enzymes. *Neuron* 12:831–844.
- Colombo-Benkmann M, Heym C, Schemann M (1995) Preganglionic sympathetic neurons, innervating the guinea pig adrenal medulla, immunohistochemically contain choline acetyltransferase and also leu-enkephalin. *Neurosci Lett* 190:155–158.
- Dal Bo G, Bérubé-Carrière N, Mendez JA, Leo D, Riad M, Descarries L, Lévesque D, Trudeau LE (2008) Enhanced glutamatergic phenotype of mesencephalic dopamine neurons after neonatal 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience* 156:59–70.
- Descarries L, Bérubé-Carrière N, Riad M, Bo GD, Mendez JA, Trudeau LE (2008) Glutamate in dopamine neurons: synaptic versus diffuse transmission. *Brain Res Rev* 58:290–302.
- Dobó E, Joó F, Wolff JR (1993) Distinct subsets of neuropeptide Y-negative principal neurons receive basket-like innervation from enkephalinergic and gabaergic axons in the superior cervical ganglion of adult rats. *Neuroscience* 57:833–844.
- Elfvén LG, Lindh B, Hökfelt T (1993) The chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia. *Annu Rev Neurosci* 16:471–507.
- Fisher JM, Sossin W, Newcomb R, Scheller RH (1988) Multiple neuropeptides derived from a common precursor are differentially packaged and transported. *Cell* 54:813–822.
- Furness JB, Morris JL, Gibbins IL, Costa M (1989) Chemical coding of neurons and plurichemical transmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29:289–306.
- Gibbins IL (1992) Vasoconstrictor, vasodilator and piromotor pathways in sympathetic ganglia of guinea-pigs. *Neuroscience* 47:657–672.
- Gibbins IL, Jobling P, Teo EH, Matthew SE, Morris JL (2003) Heterogeneous expression of SNAP-25 and synaptic vesicle proteins by central and peripheral inputs to sympathetic neurons. *J Comp Neurol* 459:25–43.
- Hattori T, Takada M, Morizumi T, Van Der Kooy D (1991) Single dopaminergic nigrostriatal neurons form two chemically distinct synaptic types: possible transmitter segregation within neurons. *J Comp Neurol* 309:391–401.
- Heym C, König R, Schröder H, Gerold N (1981) Immunofluorescent and biochemical studies on dopamine-beta-hydroxylase and catecholamines in SIF cells of the superior cervical ganglion. *Acta Histochem Suppl* 24:123–129.
- Ito T, Hioki H, Nakamura K, Tanaka Y, Nakade H, Kaneko T, Iino S, Nojyo Y (2007) Gamma-aminobutyric acid-containing sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord send their axons to the superior cervical ganglion. *J Comp Neurol* 502:113–125.
- Ito T, Iino S, Nojyo Y (2005) A part of cholinergic fibers in mouse superior cervical ganglia contain GABA or glutamate. *Brain Res* 1048:234–238.
- Jiménez B, Mora-Valladares E, Zelina ME, Morales MA (2002) Occurrence, co-occurrence and topographic distribution of choline acetyltransferase, met-enkephalin and neurotensin in the stellate ganglion of the cat. *Synapse* 43:163–174.
- Joyce MP, Rayport S (2000) Mesoaccumbens dopamine neuron synapses reconstructed *in vitro* are glutamatergic. *Neuroscience* 99: 445–456.
- Karhula T, Soinila S, Lakomy M, Majewski M, Kaleczyk J, Häppölä O (1995) 5-Hydroxytryptamine-immunoreactive nerve fibers in the rat and porcine prevertebral sympathetic ganglia: effect of precursor loading and relation to catecholaminergic neurons. *Neurosci Lett* 194:85–88.
- Kása P, Joó F, Dobó E, Wenthold RJ, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Wolff JR (1988) Heterogeneous distribution of GABA-immunoreactive nerve fibers and axon terminals in the superior cervical ganglion of adult rat. *Neuroscience* 26:635–644.
- Kondo H, Kuramoto H, Wainer BH, Yanaihara N (1985) Evidence for the coexistence of acetylcholine and enkephalin in the sympathetic preganglionic neurons of rats. *Brain Res* 335:309–314.
- Kow LM, Pfaff DW (1988) Neuromodulatory actions of peptides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 28:163–188.
- Landis SC (1988) Neurotransmitter plasticity in sympathetic neurons. In: *Handbook of chemical neuroanatomy, Vol. 6. The peripheral nervous system* (Björklund A, Hökfelt T, Owman C, eds), pp 65–115. Amsterdam: Elsevier.
- Landry M, Vila-Porcile E, Hökfelt T, Calas A (2003) Differential routing of coexisting neuropeptides in vasopressin neurons. *Eur J Neurosci* 17:579–589.
- Li C, Horn JP (2006) Physiological classification of sympathetic neurons in the rat superior cervical ganglion. *J Neurophysiol* 95: 187–195.
- Lindh B, Hökfelt T (1990) Structural and functional aspects of acetylcholine peptide coexistence in the autonomic nervous system. In: *Cholinergic Neurotransmission: Functional and Clinical Aspect, Progress in Brain Research, Vol. 84* (Aquilonius SM, Gillberg PG, eds), pp 175–191. Amsterdam: Elsevier.
- Lindh B, Staines W, Hökfelt T, Terenius L, Salvaterra P (1986) Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea pig autonomic ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5316–5320.
- Merighi A (2002) Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 66:161–190.
- Morales MA, Hancock JC, Hoover DB (2004) Neurochemical heterogeneity in sympathetic ganglia and its implications for cardiovascular regulation. In: *Neural mechanisms of cardiovascular regulation* (Dun NJ, Machado BH, Pilowsky PM, eds), pp 303–333. Boston: Kluwer Academic Publishers.

- Morales MA, Holmberg K, Xu Z, Cozzari C, Hartman B, Emson P, Goldstein M, Elfvin L, Hökfelt T (1995) Localization of choline acetyltransferase in rat peripheral sympathetic neurons and its coexistence with nitric oxide synthase and neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11819–11823.
- Morris JL, Gibbins I (1992) Co-transmission and neuromodulation. In: *Autonomic neuroeffector mechanisms* (Bumstock G, Hoyle C, eds), pp 33–119. Philadelphia: Harwood Academic Publishers.
- Morrison SF, Callaway J, Milner TA, Reis DJ (1989) Glutamate in the spinal sympathetic intermediolateral nucleus: localization by light and electron microscopy. *Brain Res* 503:5–15.
- Murphy SM, Matthew SE, Rodgers HF, Lituri DT, Gibbins IL (1998) Synaptic organization of neuropeptide-containing preganglionic boutons in lumbar sympathetic ganglia of guinea pigs. *J Comp Neurol* 398:551–567.
- Navone F, Di Gioia G, Jahn R, Browning M, Greengard P, De Camilli P (1989) Microvesicles of the neurohypophysis are biochemically related to small synaptic vesicles of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol* 109:3425–3433.
- Nishimaru H, Restrepo CE, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O (2005) Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5245–5249.
- Párducz A, Dobo E, Joo F, Wolff JR (1992) Termination pattern and fine structural characteristics of GABA- and [Met]enkephalin-containing nerve fibers and synapses in the superior cervical ganglion of adult rat. *Neuroscience* 49:963–971.
- Potter DD, Matsumoto SG, Landis SC, Sah DWY, Furshpan EJ (1986) Transmitter status in cultured sympathetic principal neurons: plasticity, graded expression and diversity. In: *Coexistence of Neuronal Messenger: A New Principle in Chemical Transmission*, Progress in Brain Research, Vol. 6 (Hökfelt T, Fuxe K, Pernow B, eds), pp 103–120. Amsterdam: Elsevier.
- Sámano CG, Zelina ME, Cifuentes F, Morales MA (2007) Cholinergic markers—choline acetyl transferase or vesicular acetylcholine transporter—and methionine-enkephalin (m-enk) immunoreactivity are co-localized in somata but preferentially located in separate axon fibers of rat sympathetic preganglionic neurons. Program No 359.9. Abstract viewer and itinerary planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience.
- Sámano C, Zelina ME, Marín MA, Cifuentes F, Morales MA (2006) Choline acetyl transferase and neuropeptide immunoreactivities are colocalized in somata, but preferentially localized in distinct axon fibers and boutons of cat sympathetic preganglionic neurons. *Synapse* 60:295–306.
- Scalettar BA (2006) How neurosecretory vesicles release their cargo. *Neuroscientist* 12:164–176.
- Semba E, Kaneko N, Mizuno M, Tohyama M (1991) Somato-, branchio- and visceromotor neurons contain glutaminase-like immunoreactivity. *Br Res Bull* 26:85–97.
- Slonimsky JD, Yang B, Hintemeder JM, Nokes EB, Birren SJ (2003) BDNF and CNTF regulate cholinergic properties of sympathetic neurons through independent mechanisms. *Mol Cell Neurosci* 23:648–660.
- Sorra KE, Mishra A, Kirov SA, Harris KM (2006) Dense core vesicles resemble active-zone transport vesicles and are diminished following synaptogenesis in mature hippocampal slices. *Neuroscience* 141:2097–2106.
- Sossin WS, Sweet-Cordero A, Scheller RH (1990) Dale's hypothesis revised: differential neuropeptides derived from a common precursor are targeted to different processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4845–4848.
- Strand FL (1999) *Neuropeptides: regulators of physiological process*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* 18:4588–4602.
- Sulzer D, Rayport S (2000) Dale's principle and glutamate corelease from ventral midbrain dopamine neurons. *Amino Acids* 19:45–52.
- Walch-Solimena C, Takei K, Marek KL, Midyett K, Südhof TC, De Camilli P, Jahn R (1993) Synaptotagmin: a membrane constituent of neuropeptide-containing large dense-core vesicles. *J Neurosci* 13:3895–3903.
- Wiedenmann B, Franke WW (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of M_r 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41:1017–1028.
- Winkler H (1997) Membrane composition of adrenergic large and small dense cored vesicles and of synaptic vesicles: consequences for their biogenesis. *Neurochem Res* 22:921–932.
- Wolff JR, Kasa P, Dobo E, Wenthold RJ, Joo F (1989) Quantitative analysis of the number and distribution of neurons richly innervated by GABA-immunoreactive axons in the rat superior cervical ganglion. *J Comp Neurol* 282:264–273.
- Yang B, Slonimsky JD, Birren SJ (2002) A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nat Neurosci* 5:539–545.
- Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC (2001) Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron* 29:131–143.