



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ANÁLISIS DE LA SEGREGACIÓN DE TRANSMISORES CLÁSICOS Y
CO-TRANSMISORES EN NEURONAS SIMPÁTICAS ANTE DISTINTOS
FACTORES AMBIENTALES

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
ANABELL VEGA ESPINOZA

TUTOR PRINCIPAL:
DR. MIGUEL A. MORALES MENDOZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTORAL:
DRA. MARTHA LEÓN OLEA
FACULTAD DE MEDICINA

DR. RAÚL AGUILAR ROBLERO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D.F. ENERO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 en el Laboratorio del Doctor Miguel Ángel Morales Mendoza, del departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

El proyecto contó con financiamiento del presupuesto institucional del IIB-UNAM, CONACyT y DGAPA-PAPIIT UNAM No. 227409

Anabell Vega Espinoza fue becaria de CONACyT, No. 211372, obtuvo apoyo económico en 2008 del PAEP y una beca mixta en 2010 para la realización de estancias académicas en el extranjero. También obtuvo becas de hospedaje por parte del Capítulo Mexicano de la Sociedad de Neurociencias para asistir a los congresos de la sfn en 2008 y 2010.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Miguel A. Morales Mendoza y Fredy Cifuentes Navarro por las enseñanzas y apoyos permanentes desde el 2006 hasta la actualidad.

A la Dra. Martha León Olea y Dr. Raúl Aguilar Roblero miembros de mi comité tutorial por los acertados comentarios y sugerencias que me permitieron enriquecer mi papel como aspirante a obtener el grado de Dra. en ciencias biomédicas.

A los Dres. Gabriel Gutiérrez Ospina, Gabriel Roldán Roldán, Martha Escobar Rodríguez y Roberto Domínguez Casalá, miembros del jurado por su participación, comentarios y sugerencias.

A Ma. Elena Zetina y Pedro Medina técnicos del laboratorio por los conocimientos compartidos y apoyo constante.

A mis compañeros pasados y presentes: Dra. Cynthia Sámano, Dr. Rafael Vargas, Rommel, Diana, Raúl, Manuel, Jesica, Alejandra y Luis por las discusiones sobre mi proyecto de investigación, enseñanzas, y momentos de diversión.

Al M.C. Heberto Quintero, Dr. Jonathan García, M.C. Lizbeth Sánchez, Dra. Mónica Ramírez, M.C. Omar Echeverría y por sus críticas, sugerencias y valiosa amistad.

A todo el personal académico, administrativo y estudiantil del IIB por su constante colaboración.

A CONACyT, DGAPA-PAPIIT, PAEP y al capítulo mexicano de la sociedad de neurociencias por las becas otorgadas.

Al PDCB por brindarme la oportunidad de alcanzar mis metas.

A la UNAM por proveer los recursos necesarios para la realización de esta tesis y permitirme ser parte de esta grandiosa comunidad.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

- Antecedentes de neurotransmisión
- Co-transmisión
- Segregación de neurotransmisores
- Segregación en neuronas del sistema nervioso autónomo
- Potencial de plasticidad de la segregación en neuronas simpáticas

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- Pregunta de investigación

4. HIPÓTESIS

5. OBJETIVOS

- Objetivo general
- Objetivos específicos

6. METODOLOGÍA

I. Experimentos en cultivos celulares

II. Experimentos in vivo

7. RESULTADOS

I. Experimentos en cultivos celulares

II. Experimentos in vivo

8. DISCUSIÓN

I. Condiciones de neuronas en cultivo

II. Condiciones de neuronas in vivo

9. CONCLUSIONES

10. REFERENCIAS

11. APÉNDICE I

- Artículo publicado

ABREVIATURAS

5-HT: 5-hidroxytriptamina o serotonina

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

ACh: Acetilcolina

AMCA: Acetato de amino-metilcoumarina

AraC: Citosina arabinosida

Axt: Axotomizado

BDNF: Neurotrofina derivada de cerebro

BSA: Suero de albúmina bovina

CGRP: Péptido del gen relacionado con la calcitonina

ChAT: Colina acetiltransferasa

CNTF: Factor neurotrófico ciliar

CO: Monóxido de carbono

Ctl: Control

Cy5: Cinanina 5

DA: Dopamina

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GABA: Ácido γ -amino butírico

GCS: Ganglio cervical superior

Glu: Glutamato

IR: Inmunorreactividad

LDCV: Vesículas grandes de núcleo denso

mENK: metionina encefalina

NA: Noradrenalina

NE: Norepinefrina

NGF: Factor de crecimiento neural

NO: Óxido nítrico

NPS: Neuronas preganglionares simpáticas

NPY: Neuropeptido Y

NT 3d: Sin tratamiento 3 días

NT 3w: Sin tratamiento 3 semanas
PA: Potencial de acción
PBS: buffer de fosfatos
PC12: Feocromocitoma 12
Rt: Restitución de NGF
scv: Vesículas pequeñas claras
SD: Desviación estándar
SEM: Error estándar de la media
SNA: sistema nervioso autónomo
SNC: Sistema nervioso central
Syn: Synaptofosina
SynI: Sinapsina I
TGN: Trans Golgi network
TH: Tirosina hidroxilasa
TxR: Texas red
VACHT: Transportador vesicular de acetilcolina
VIP: Péptido intestinal vasoactivo
VMAT2: Transportador vesicular de monoaminas 2
Yoh: yohimbina

RESUMEN

Las neuronas simpáticas tienen la capacidad de responder ante estímulos del medio ambiente; esta plasticidad afecta la expresión de proteínas vesiculares, de receptores iónicos, entre otros aspectos de la transmisión sináptica.

En este estudio evaluamos la influencia del entorno neuronal en la segregación de neurotransmisores en neuronas simpáticas. Primero estudiamos el efecto de la exposición a CNTF y el prolongar el periodo de cultivo en la expresión de marcadores para NE, ACh y NPY en neuronas ganglionares en co-cultivo con miocitos cardiacos. Encontramos que ambos modelos incrementan la expresión del transportador vesicular de ACh (VACHT); además que CNTF favorece la segregación del péptido NPY de las terminales axonales positivas al transportador vesicular de monoaminas (VMAT2) y aumenta la coexistencia de VACHT con NPY. El prolongar el periodo de cultivo 3 semanas promueve la expresión de NPY en botones sinápticos carentes de VMAT2 así como la presencia de botones positivos a VACHT negativos a VMAT2. Adicionalmente observamos que estas neuronas simpáticas presentan dos tipos de varicosidades distintas en tamaño y en el nivel de segregación de los neurotransmisores analizados.

Por otra parte analizamos la segregación de VACHT con el péptido metionina encefalina (mENK) en neuronas preganglionares simpáticas *in vivo*. Encontramos que en condiciones que reducen la disponibilidad de NGF derivado del blanco en las neuronas ganglionares, las neuronas preganglionares presentan una mayor proporción de botones positivos a mENK carentes de VACHT. Estos cambios pueden ser revertidos con la aplicación de este factor neurotrófico. Otro aspecto a destacar es que bajo dichas condiciones la expresión de VACHT aumenta mas no así su nivel de coexistencia con un marcador de vesículas sinápticas el cual disminuye.

Los resultados obtenidos apoyan nuestra propuesta de que el ambiente neuronal o bien, el blanco sináptico modifican la segregación de neurotransmisores en las terminales axonales presinápticas, sin modificar su completa co-existencia en los cuerpos celulares.

ABSTRACT

Sympathetic neurons are able to respond to environment clues; vesicular proteins expression, receptor molecules, and other aspects of synaptic transmission have been involved in these plasticity phenomena.

In this work we analyzed the influence of neuronal environment in the segregation of neurotransmitter in sympathetic neurons. At first, we studied at ganglionic neurons in co-culture with cardiac myocytes the effect of CNTF and prolonged culture period in the expression of markers for NE, ACh and NPY. We found that CNTF and prolonged culture period enhance the expression of the vesicular acetylcholine transporter (VACHT). Furthermore, we found that CNTF increases the segregation of NPY from vesicular monoamines transporter 2 (VMAT2)-positive puncta and, also the co-existence of VACHT with NPY. Meanwhile, prolonged period of culture promotes the independent expression of NPY in axonal terminals according to VMAT2, as well the presence of VACHT-positive VMAT2-negative processes. In addition, we showed sympathetic neurons project two different size varicosities which differ on the neurotransmitters segregation level.

On the other hand, we analyzed the segregation of VACHT and the methionine-enkephalin (mENK) peptide at sympathetic neurons *in vivo*. We found that under conditions that reduce the target derived NGF availability on ganglionic neurons, the preganglionic ones have a larger ratio of mENK-positive VACHT-negative puncta, these changes could be abolished with the exogenous administration of this neurotrophic factor. Another finding is that although VACHT expression is enhanced their coexistence with the synaptic vesicle marker synaptophysin (Syn) decreases.

The evidence here supports the hypothesis that target neuronal environment modifies the segregation of neurotransmitters at presynaptic puncta without changing their co-expression at cell bodies level.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes de Neurotransmisión

Las neuronas transmiten sus señales entre ellas a través de sinapsis eléctricas y químicas. En las sinapsis eléctricas la corriente se propaga directamente de una célula a otra a través de poros llamados uniones comunicantes. Mientras que en las químicas las neuronas al recibir un estímulo liberan sustancias químicas conocidas como neurotransmisores las cuales por medio de un potencial de acción (PA) transmiten la información recibida hacia la postsinapsis. Éste último tipo de comunicación neuronal es la que compete a este trabajo.

Tomó alrededor de 35 años la acumulación de evidencias que mostraran que las neuronas secretaban sustancias químicas en sus sinapsis. Los trabajos pioneros fueron realizados por John N. Langley (en 1900) quien observó similitud entre los efectos producidos por la estimulación nerviosa simpática y la aplicación directa de adrenalina en tejidos cuyas aferencias simpáticas habían sido cortadas quirúrgicamente o degeneradas. La siguiente aproximación al esclarecimiento de la transmisión química fue realizada por Thomas R. Elliot, 1904, cuyas conclusiones fueron “la adrenalina podría ser el estimulante químico liberado cada ocasión que el impulso (nervioso) arriba a la periferia”. Sin embargo, la demostración contundente de la neurotransmisión química fue documentada por primera vez en 1921; Otto Loewi encontró que la solución de perfusión de un corazón de rana inervado por el nervio vago contenía una sustancia química que era liberada al estimular eléctricamente dicho nervio y esta sustancia era capaz de producir una respuesta inhibitoria al bañar a otro corazón que no estaba en contacto eléctrico con el primero. Años más tarde, Henry Dale y Wilhelm Feldberg identificaron a la acetilcolina (1933) como la sustancia liberada del nervio vago en los experimentos de Loewi (ver Valenstein, 2002).

Los nuevos descubrimientos permitieron a Dale acuñar el concepto de neurotransmisión química (1935) y enunciar que “todo tipo de neuronas como unidades metabólicas que incluyen el soma y todos sus procesos celulares y cuyas sinapsis operan con el mismo mecanismo de transmisión química” (citado en: Whittaker, 1984). Con lo anterior se aceptaba que las neuronas podían utilizar en sus sinapsis un solo neurotransmisor, ya fuera

de naturaleza excitatoria o inhibitoria pero solo una molécula transmisora podía estar presente en una neurona. Estos hallazgos les valieron a Otto Loewi y Henri Dale el premio Nobel en fisiología y medicina de 1936.

En la década de los 60's, por medio de técnicas bioquímicas, electrofisiológicas, de microscopía de luz y electrónica, se lograron aislar e identificar diversas moléculas (como aminoácidos), que junto con los neurotransmisores ya identificados participaban en la transmisión sináptica. La siguiente tabla muestra de manera general las características que debe cumplir una sustancia química para ser considerada un neurotransmisor (Merighi, 2002; Deutch and Roth, 2004):

1. Ser sintetizada en la neurona.
2. Poseer la maquinaria enzimática específica necesaria para su síntesis y vesiculación (y en algunos casos, reciclaje).
3. Ser liberados en respuesta a un potencial de acción.
4. Influir en la excitabilidad de la célula receptora.
5. Ser removidos o degradados al finalizar su acción.
6. Al ser aplicados de manera exógena, tienen el mismo efecto que la proteína sintetizada endógenamente.

En la actualidad existen numerosas sustancias que cumplen con estas características; las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en el sistema nervioso tanto central como periférico. Su clasificación química se encuentra en la 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).

Co-transmisión

Una vez aceptada la neurotransmisión química y la posterior conceptualización de que las neuronas operaban todos sus procesos con la misma substancia neurotransmisora se reportaron evidencias que desafiaban al llamado principio de Dale (1955) “una neurona un neurotransmisor”.

En la década de los 60's se encontraron en preparaciones aisladas de músculo liso de roedores respuestas electrofisiológicas que no podían ser atribuidas a los mecanismos de acción de ACh o NA, que eran los neurotransmisores descritos en el sistema nervioso autónomo (SNA) hasta entonces; por lo cual las nombraron “respuestas no adrenérgicas, no colinérgicas, NANC”. Tras años de estudios, se concluyó que el ATP era el responsable de estos efectos NANC y que actúa como co-transmisor con la NA y NPY en el *vas deferens* (ver Burnstock, 1976).

Posteriormente, Lundberg *et al.*, 1980 concluyeron que el VIP actúa como co-transmisor de ACh en glándulas salivales de gato. Con experimentos histológicos y funcionales observaron que VIP produce vasodilatación y modula la respuesta producida por ACh en esta sinapsis.

Tras las crecientes evidencias de la existencia de más de una molécula mensajera en neuronas individuales el principio de Dale se reformuló a “las neuronas operan con la misma combinación de neurotransmisores en todos sus procesos”; y de manera paralela se clasificó a los neurotransmisores dentro de dos grupos: transmisores clásicos y co-transmisores. También fue necesario acuñar el término co-existencia el cual se refiere a que las neuronas son capaces de sintetizar más de una molécula mensajera y liberarlas simultáneamente desde una misma terminal axónica en respuesta a un potencial de acción.

Los criterios para la clasificación de neurotransmisores en clásicos o co-transmisores incluyen síntesis y procesamiento, empaquetamiento, liberación, modo de acción, remoción y reciclamiento. Los transmisores clásicos son sintetizados en el citosol de las terminales nerviosas en regiones cercanas a su sitio de liberación; este proceso es llevado a

cabo por enzimas previamente sintetizadas en el cuerpo celular y trasladadas a la terminal nerviosa por transporte axonal. Una vez sintetizados, los transmisores clásicos son almacenados dentro de vesículas pequeñas claras (scv; 30-50 nm de diámetro) mediante una ATPasa de la membrana vesicular que intercambia protones del lumen por una molécula del transmisor citosólico recién sintetizado; por ejemplo, el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) transporta del citosol hacia el interior de las scv ACh sintetizada previamente en el citoplasma axonal mediante la acción de la enzima colina acetil-transferasa (ChAT; Schuldiner *et al.*, 1995).

Por otra parte, los co-transmisores son almacenados en vesículas grandes de núcleo denso (LDCV; 100 nm de diámetro) en la red del trans-Golgi (TGN) como grandes precursores y trasladados por transporte anterógrado rápido hacia los botones axónicos; simultáneamente a su transporte este precursor sufre modificaciones enzimáticas tales como acetilaciones, proteólisis, fosforilaciones, entre otras (Mains *et al.*, 1987).

La exocitosis de ambos tipos de vesículas, las scv y las LDCV depende de la entrada de calcio a los botones presinápticos. Para la liberación de las scv, se requiere una pronunciada entrada de calcio que aumente la concentración del valor basal de 20 nM a 100 nM hasta 200-300 μ M. Este acentuado aumento no ocurre en todo el citoplasma del botón si no se restringe a micro-regiones circundantes a los sitios de exocitosis en la zona activa conocidos como microdominios de calcio (Llinás *et al.*, 1992). Por su parte, las LDCV requieren un menor pero global aumento (400 nM) en la $[Ca^{2+}]_i$ (Verhage *et al.*, 1991) para llevar a cabo la exocitosis, la cual ocurre en regiones periféricas a la zona activa (Zhu *et al.*, 1986).

Con relación a su modo de acción, la diferencia entre ambos tipos de neurotransmisores es que los clásicos desencadenan cambios en las propiedades eléctricas de la célula postsináptica y en algunos casos, presinápticas; mientras que los co-transmisores por si solos no modifican la polaridad de la membrana y sólo modulan positiva o negativamente la respuesta inducida por el clásico (Strand, 1999).

Finalmente, otra diferencia entre ambas clases de transmisores es que tras su liberación, después del acoplamiento ligando-receptor en la post-sinapsis, los transmisores clásicos pueden ser degradados por enzimas proteolíticas en la hendidura sináptica, o pueden ser recapturados por elementos pre-sinápticos o células gliales mientras que no se ha reportado el reciclaje de co-transmisores, éstos solo pueden ser repuestos por síntesis *de novo* en el cuerpo neuronal; las membranas tienen que ser transportadas retrógradamente al cuerpo celular donde son recargadas de nuevo con péptidos o reciclados en el Golgi.

Hasta ahora se han encontrado diversas combinaciones de co-existencia de transmisores clásicos y co-transmisores en las sinapsis químicas. La más común es de un transmisor clásico y uno o más co-transmisores (Lundberg, 1996; Merighi, 2002), las demás combinaciones de sustancias mensajeras que se han detectado son:

Transmisor clásico + co-transmisor + ATP (Burnstock, 1976)

Transmisor clásico + ATP (Jo and Schlichter, 1999)

Transmisor clásico + neurotrofinas (Lachmund *et al.*, 1994)

Transmisor clásico + NO o CO o Zn^{2+} (Morales *et al.*, 1995; Barañano *et al.*, 2001)

Transmisor clásico + transmisor clásico (Nicoll and Malenka 1998; Sulzer and Rayport, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2003; Gutiérrez, 2005; Trudeau and Gutiérrez, 2007)

Co-transmisor + co-transmisor (Landry *et al.*, 2003)

Segregación de neurotransmisores

Para explicar la co-transmisión, inicialmente se propuso la co-existencia y co-liberación de diferentes transmisores en todas las sinapsis de una misma neurona. Evidencias posteriores, entre ellos resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que las neuronas no necesariamente co-almacenan y co-liberan la misma combinación de transmisores desde todos sus botones presinápticos, sino que también pueden almacenar separadamente a sus transmisores en botones presinápticos diferentes y de ahí liberarlos concurrentemente. Es decir que algunas neuronas tienen la capacidad de segregar o enviar

diferencialmente transmisores clásicos y co-transmisores hacia sus distintos botones sinápticos.

De las primeras evidencias de segregación están las de Sossin *et al.*, 1990 quienes estudiaron mediante microscopía electrónica la distribución de dos péptidos derivados del gen que da origen al péptido de la hormona de ovulación (Egg-laying hormone, ELH) en el molusco *Aplysia californica*. Encontraron que los péptidos pertenecientes a la región amino terminal y a la carboxil terminal de este gen son empaquetados en vesículas separadas en la bolsa neuronal; por consiguiente, estos péptidos co-localizan al nivel de soma de estas neuronas, sin embargo dichas vesículas son dirigidas hacia distintos procesos celulares de acuerdo a su contenido. En los procesos del manto se observan vesículas con ambos tipos de péptidos, mientras que en los de la región abdominal solo se observan vesículas que contienen péptidos derivados de la región amino terminal de la ELH.

Existen varios reportes de segregación de transmisores en neuronas de mamífero, Hattori *et al.*, 1991 encontraron que las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas proyectan dos tipos de procesos axonales, unos positivos a la enzima limitante de la dopamina, la tirosina hidroxilasa (TH) que hacen sinapsis asimétricas y otros negativos a TH con sinapsis simétricas indicando que estas neuronas distribuyen diferencialmente la TH a sus diferentes procesos axonales. En la sinapsis motoneurona espinal-interneurona de Renshaw de la médula espinal se encontró que la acetilcolina y el glutamato no co-existen en sus terminales, mientras que la ACh es liberada hacia la unión neuromuscular el glutamato es liberado hacia las interneuronas (Nishimaru *et al.*, 2005). El grupo de Rayport fue el primero en mostrar evidencias de segregación de transmisores clásicos en neuronas del sistema nervioso central (SNC) de mamíferos, este grupo encontró tanto *in vivo* como en cultivo que las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental segregan dopamina y glutamato hacia diferentes terminales axónicas (Sulzer *et al.*, 1998; Joyce and Rayport, 2000; Sulzer and Rayport, 2000; Rayport, 2001).

Segregación en neuronas del sistema nervioso autónomo

En nuestro grupo hemos investigado la posible segregación de neurotransmisores en las neuronas simpáticas. Estas neuronas se encuentran localizadas en el núcleo intermediolateral de la médula espinal (Houser *et al.*, 1983) y hacen sinapsis con neuronas ganglionares en el GCS (Lindh *et al.*, 1986). Son de naturaleza colinérgica y junto con la acetilcolina co-expresan los neuropéptidos mENK (Schultzberg *et al.*, 1978; Schultzberg *et al.*, 1979), VIP (Lundberg and Hökfelt, 1986), CGRP (Yamamoto *et al.*, 1989; Morales *et al.*, 1995) y SP (Gibson *et al.*, 1981).

Las primeras evidencias indicativas de segregación de transmisores en la NPS surgen de los trabajos de Lindh *et al.*, 1986 y de Morales *et al.*, 1995 quienes encontraron en terminales nerviosas simpáticas botones positivos a mENK carentes de expresión a marcadores del neurotransmisor clásico de esas sinapsis, la ACh. Como nuevas evidencias de segregación en nuestro grupo hemos encontrado que las neuronas preganglionares simpáticas del GCS de rata co-expresan a la enzima ChAT (Morales *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 2002) y al transportador VAChT (Sámamo *et al.*, 2006; Sámamo *et al.*, 2009) con diversos neuropéptidos en sus somas, pero en sus procesos axonales, los péptidos se expresan en botones sinápticos negativos a los marcadores colinérgicos. Estos resultados apoyan la noción que las NPS tienen la capacidad de segregar a sus transmisores a diferentes botones sinápticos de tal manera que estas neuronas colinérgicas en las que se esperaría la presencia de ACh en todos sus procesos axonales, presentan varicosidades peptidérgicas que no reciben ACh. La posibilidad de que estos botones peptidérgicos no colinérgicos no sean de origen simpático preganglionar se descartó con la descentralización del ganglio que produjo la eliminación de todos estos botones positivos exclusivamente a péptidos (Sámamo *et al.*, 2006).

Potencial de plasticidad de la segregación en neuronas simpáticas

El tipo de neurotransmisores que las neuronas expresan puede ser influenciado por el ambiente neuronal; las neuronas del GCS de ratas neonatas, que normalmente liberan NA *in vivo* (Elfvín *et al.*, 1993) al cultivarlas con miocitos cardiacos o bajo condiciones que favorecen la proliferación de células ganglionares no neuronales (incluyendo células de

Schwann y fibroblastos) forman sinapsis tanto entre ellas como con los demás tipos celulares del co-cultivo. Estas sinapsis inicialmente adrenérgicas pueden llegar a ser colinérgicas. Cuando se agrega al co-cultivo factores que inhiben el crecimiento de células no neuronales, el efecto observado es inhibido (O'Lague *et al.*, 1978). Durante su transformación a colinérgicas, las neuronas pasan una etapa en la que expresan características de ambos fenotipos químicos (O'Lague *et al.*, 1974; Yamamori *et al.*, 1989; Ernsberger and Rohrer, 1999).

También, se ha observado que factores neurotróficos modifican la naturaleza de la transmisión química en co-cultivos de neuronas simpáticas con cardiomiocitos; tras potenciar los latidos de estos miocitos por la liberación de NA, en la condición basal, la aplicación de BDNF induce la liberación de ACh con la consecuente reducción en los latidos (Yang *et al.*, 2002; Slonimsky *et al.*, 2003).

El cambio de NA a ACh también ocurre *in vivo*. En el mamífero adulto, las glándulas sudoríparas ecquinas son inervadas por células ganglionares simpáticas colinérgicas. Durante el desarrollo estas glándulas sudoríparas son inervadas inicialmente por fibras noradrenérgicas que cambian gradualmente su fenotipo a colinérgico (Landis, 1983; Landis and Keefe 1983).

También se ha visto en neuronas de ganglio simpático en cultivo que la expresión de péptidos como la SP puede ser modulada por el órgano blanco, a través de la liberación de factores de crecimiento, o por contacto con otras células, con componentes de la matriz extracelular y por actividad eléctrica o aumento en la densidad neuronal (Adler and Black, 1984).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando la amplia capacidad del sistema nervioso, incluido el sistema nervioso simpático, para modificar su fenotipo durante el desarrollo y en algunas condiciones experimentales, es relevante pensar que la capacidad de segregar mediadores sinápticos a diferentes botones pudiera ser también susceptible de cambios adaptativos del entorno neuronal.

Pregunta de investigación

¿La segregación de neurotransmisores en las fibras y terminales axonales de las neuronas simpáticas presenta un patrón de distribución permanente o puede ser modificada por la influencia de diferentes condiciones del entorno neuronal?

HIPÓTESIS

El entorno neuronal modifica el patrón de segregación de transmisores clásicos y co-transmisores en las terminales axonales de neuronas simpáticas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Explorar si el patrón de segregación de neurotransmisores en las neuronas simpáticas es modificado por la influencia de diferentes condiciones del entorno sináptico.

Para cubrir este objetivo y dado los resultados de cambios de fenotipo encontrados tanto en cultivo como *in vivo*, decidimos investigar esta posibilidad en las dos condiciones experimentales, por lo que nos propusimos los siguientes:

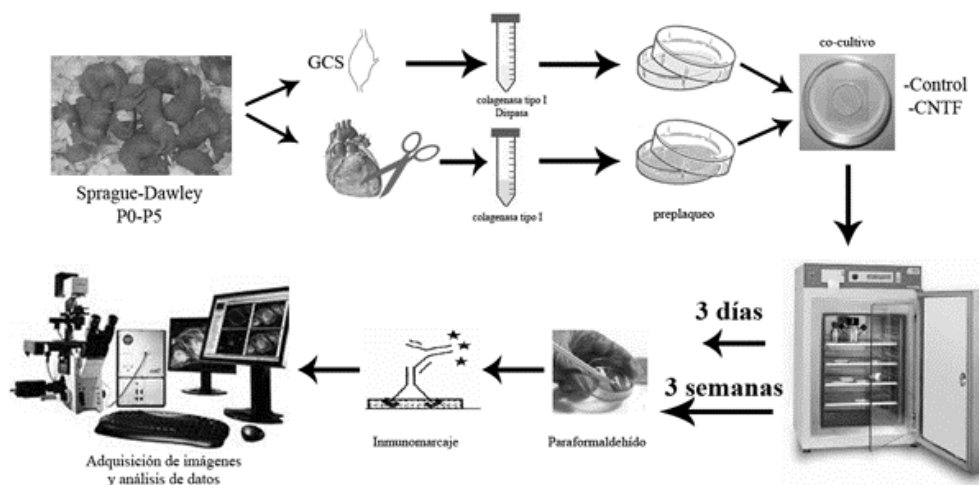
Objetivos específicos

- Explorar el patrón de segregación de neurotransmisores en co-cultivos de neuronas simpáticas con miocitos ante distintas condiciones ambientales del entorno sináptico.
- Explorar el patrón de segregación de neurotransmisores en las NPS *in vivo* ante distintas condiciones ambientales del entorno sináptico.

METODOLOGÍA

I. Experimentos en cultivos celulares

Los experimentos realizados en co-cultivos celulares de neuronas simpáticas con miocitos cardiacos de rata recién nacida se resumen en el siguiente diagrama:



-Co-cultivos de neuronas ganglionares con cardiomiocitos

Se utilizaron ratas neonatas (P0-P5) de ambos sexos de la cepa Sprague-Dawley (Charles River Laboratories; Wilmington, MA). El protocolo para este procedimiento fue aprobado por el comité institucional de uso y cuidado animal de la Universidad de Brandeis y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Las crías (10-15 por experimento) fueron decapitadas y se les extrajeron los GCS y una porción de la zona apical del corazón. Las células fueron aisladas por digestiones enzimáticas: las neuronas con 2.6 mg/mL de colagenasa tipo I (Worthington; Lakewood, NJ) y 6.4 mg/ml de dispasa (Gibco; Carlsbad, CA); los miocitos con 1.42 mg/mL de colagenasa tipo I se cuantificaron y fueron sembrados 7,500-15,000 neuronas y 50,000 cardiomiocitos en platos de cultivo con fondo de cristal (MatTek; Ashland, MA) previamente revestidas con 100 µg/mL de colágena y 0.5 mg/mL de poli-lisina D. Se utilizó el medio de cultivo MAH 2x con suero fetal bovino (FBS, Sigma; St. Louis, MI), penicilina/estreptomicina (GIBCO), L15 (GIBCO), así como 5 ng/µl de NGF 2.5S (Upstate Biotech; Lake Placid, NY) para garantizar la supervivencia celular.

Después de un día de cultivo se agregó 1 μ M de arabinofuranosida (AraC; Sigma) para frenar la división celular. Bajo estas condiciones el AraC no tiene efectos en la supervivencia o función de las neuronas simpáticas en cultivo (Chun *et al.*, 1977; Martin *et al.*, 1990). Cuando se indica el medio se suplementó con 10 ng/ μ l de CNTF (R&D Systems; Minneapolis, MN). Se realizó cambio de medio de cultivo cada segundo día. Los co-cultivos permanecieron en una incubadora a 37 °C y 5% de CO₂ durante 3 días o 3 semanas antes de ser fijados con paraformaldehído (Sigma) 4%.

-Inmunohistoquímica

Después de ser fijadas las células, se realizaron 2 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 0.1 M, seguido de una permeabilización con 0.1% Nonidet P-40 (Sigma) durante 10 minutos y un bloqueo con suero de burro 10% durante 30 minutos. Posteriormente se aplicó un cóctel de anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas de interés: VACHT, VMAT2, NPY y α -actinina ó VACHT, VMAT2, SynI y α -actinina (Tabla 3) que se mantuvo de un día para otro a 4 °C. Al día siguiente se realizaron dos lavados con PBS 0.1 M de 10 minutos cada uno y se aplicaron durante 2 horas a temperatura ambiente anticuerpos secundarios dirigidos hacia los anticuerpos primarios empleados, nuevamente se realizaron lavados con PBS 0.1 M. Una vez finalizado el proceso de inmunohistoquímica se aplicó medio de montaje N-propil galato.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para el inmunomarcaje *in vitro*

Antisueros	Tipos de anticuerpos	Acoplados a	Diluciones	Compañías
Primario				
VMAT2	Cabra policlonal	----	1:1000	Santa Cruz; St. Cruz, CA
VACHT	cobayo policlonal	----	1:500	Neuromab; Davis, CA
NPY	Conejo policlonal	----	1:2000	Bachem; Bubendorf, Suiza
SynI	Conejo policlonal	----	1:500	Chemicon, Temecula, CA
α -actinina	Ratón monoclonal	----	1:800	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Secundario				
Anti-cabra IgG	Burro	Rodamina	1:400	Jackson Immunoresearch; West Grove, PA
Anti-cobayo IgG	Burro	FITC	1:400	Jackson Immunoresearch.

Anti-conejo IgG	Burro	Cy5	1:200	Jackson Immunoresearch.
Anti-ratón IgG	Burro	AMCA	1:200	Jackson Immunoresearch.

-Captura y procesamiento de imágenes

Las células fueron observadas con un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX-70 provisto con filtros para FITC, Rodamina, Cy5 y AMCA. En cada experimento se capturaron imágenes de 8 regiones seleccionadas al azar con una cámara digital Orca-ER CCD (Hamamatsu, Japan) y el programa de adquisición Volocity (Versión 3.0.3; Perkin Elmer, Waltham, MA). Con el programa de análisis de imágenes Metamorph (v. 7.5.6; Universal Imaging Corporation, Molecular Devices, Downingtown, PA), analizamos 5 experimentos por cada condición estudiada: 3 días de cultivo sin tratamiento (NT 3d), 3 días de cultivo con CNTF (CNTF 3d) y 3 semanas de cultivo sin tratamiento (NT 3w). Aplicamos una función de deconvolución a las imágenes para mejorar el plano focal; posteriormente determinamos en somas y en varicosidades la inmunoreactividad de los marcadores empleados como aquellos puntos que son más intensos que el ruido de fondo (promedio \pm 2 SD). Posteriormente determinamos la población de pixeles que presenta IR para dos marcadores utilizados. Para determinar la cantidad total de IR de VACHT, de los péptidos o de SynI, esta se expresó como porcentaje del área ocupada respecto al área total. La segregación entre dos marcadores la expresamos como el porcentaje de varicosidades que expresan un marcador (ejemplo VMAT2) pero no expresan al otro analizado (NPY). En consecuencia una segregación de 100% indica que ninguno de los botones analizados expresa a ambos marcadores, mientras que una segregación de 0% indica que todas las varicosidades expresan a ambos.

Además de analizar la segregación de neurotransmisores en las varicosidades de neuronas simpáticas en co-cultivo con cardiomiocitos analizamos posibles diferencias en localización, tamaño y contenido de neurotransmisores en estas estructuras neuronales. Con el marcaje con SynI clasificamos dos tipos de varicosidades de acuerdo a su distancia al soma: encontramos botones que aparentemente hacían contacto con somas y los llamamos “perisomáticos”, que significa que están cercanos a los somas y “neuríticos” o

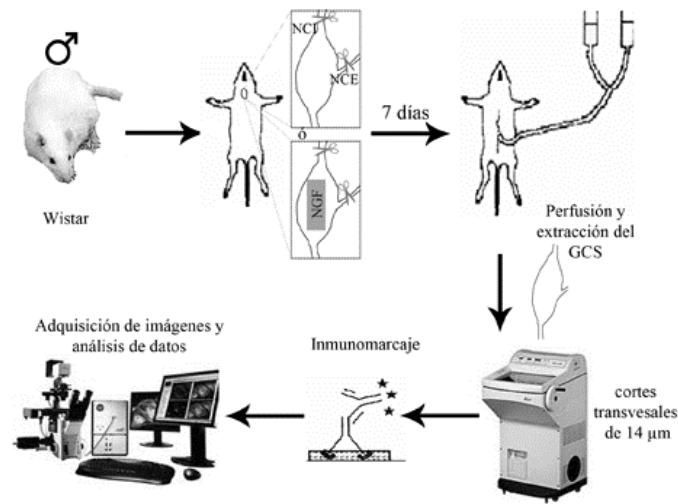
varicosidades distantes los cuales definimos como aquellas varicosidades a $>25 \mu\text{m}$ de distancia de cualquier cuerpo celular. Con esto nos cercioramos que las varicosidades neuríticas no están contactando somas, aunque podrían estar contactando a otras neuritas o a los cardiomiocitos. Analizamos un total de 1212 varicosidades inmunoreactivas de 5 experimentos. Los datos obtenidos los expresamos como el promedio \pm SEM y se sometieron a una prueba de ANOVA de 2 vías (2 tipos de varicosidades en tres distintas condiciones) seguido de la prueba post-hoc de Fisher. Las diferencias fueron consideradas significativas si $p < 0.05$.

-Registros electrofisiológicos

Las células en co-cultivo se observaron con un microscopio invertido Olympus IX-70 con contraste de fases de interferencia diferencial (DIC). El medio de cultivo fue lavado de la caja de cultivo 15 minutos previos al inicio de todos los experimentos. Los registros de corriente y voltaje se realizaron con un Axopatch 200B, fueron analizados con el programa pClamp 8 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los registros electrofisiológicos se realizaron en presencia de una solución salina externa consistente en (mM): NaCl 150, KCl 3, MgCl₂ 2, Na HEPES 5, CaCl₂ 2 y dextrosa 11; pH 7.4, ajustado a 330 mOsmol con sacarosa. Los electrodos de Patch (2–6 MO) se realizaron a partir de vidrio de borosilicato (Warner Instruments Inc., Hamden, CT) en un estirador de micropipetas horizontal Flaming/Brown, modelo P-97 (Sutter Instrument Co, Novato, CA). La solución dentro de la micropipeta de patch contenía, en mM: K gluconato 100, KCl 30, MgSO₄ 1, CaCl₂ 1, EGTA 10, HEPES 10, Na 3, y K₂ATP 2; pH 7.4, ajustado a 300 mOsmol con sacarosa. La transmisión noradrenérgica (α) o colinérgica (nicotínica) fue bloqueada con 1–10 μM yohimbina (Research Biochemical International, Natick, MA) o 100 μM hexametonio (Sigma, St. Louis, MO), respectivamente. Se aplicó NE en el baño a 10–200 μM (Research Biochemical International, Natick, MA).

II. Experimentos *in vivo*

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200-300 gramos de peso corporal y 9 semanas de edad con alimentación *ad libitum* y ciclos de luz oscuridad 12/12, que fueron provistas por el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los animales de experimentación fueron tratados de acuerdo a los lineamientos establecidos por la comisión de bioética del Instituto. Se estudiaron 3 grupos experimentales: control, axotomía y axotomía con reemplazo de NGF. El procedimiento se ejemplifica en el siguiente diagrama:



Procedimientos Quirúrgicos

-Axotomía

Las ratas se anestesiaron con xilazina (10 mg/kg) y ketamina (90 mg/kg). Después de localizar el GCS y sus nervios postganglionares: carotideo interno y externo, estos fueron cortados con pinzas quirúrgicas, se suturaron las heridas y las ratas permanecieron bajo cuidados postoperatorios durante 7 días.

-Axotomía y reemplazo de NGF

En el mismo momento quirúrgico, tras la axotomía descrita en el párrafo anterior, se colocó un parche de ELVAX® (DuPont, Wilmington, Delaware) de 6 mm² de superficie conteniendo 25 µg de β-NGF (2.5S, Millipore) en contacto directo con la cara interna del GCS axotomizado. Se suturaron las heridas y se les dieron a los animales cuidados postoperatorios durante 7 días.

-Preparación parche de ELVAX®

Para la restitución de NGF elaboramos una placa de ELVAX® como a continuación se describe: Por cada miligramo de ELVAX® adicionamos 15 µL de diclorometano, para solubilizar al polímero; agregamos también 25 µg/µL de NGF o bien solo el vehículo (PBS). Agitamos la mezcla durante 30 minutos hasta la completa disolución del ELVAX®; posteriormente la introducimos en un molde y la almacenamos durante 1 semana a -20 °C para permitir la evaporación completa del solvente. El día de experimento de reemplazo de NGF cortamos con un bisturí un trozo de la placa de 6 mm² bajo un microscopio estereoscópico sobre hielo seco. Inmediatamente después, colocamos este parche en contacto directo con la cara interna del GCS recién axotomizado.

-Perfusión y extracción de tejido

7 días posteriores a la cirugía, los animales se anestesiaron y fueron perfundidos vía intracardiaca con 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 0.01 M, pH 7.4) por 3 min, seguida de 250 mL de una solución fijadora (paraformaldehído 2% en PB 0.1 M y ácido pícrico 0.18%, pH 7.4); en el caso de la detección de NGF las ratas se perfundieron con una solución de ácido acético al 5% con cloruro de sodio 0.9% a pH 3.0 seguida de la solución fijadora. Los GCS fueron extraídos y permanecieron en post-fijación durante la noche; al día siguiente los GCS se deshidrataron en una solución de sacarosa al 30%.

-Inmunohistoquímica

En un crióstato a -20 °C obtuvimos cortes longitudinales del GCS 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 inmunomarcaje de acuerdo al siguiente procedimiento:

-Detección de marcadores sinápticos en GCS control, axotomizados y reemplazo de NGF. Los cortes de GCS control, axotomizados y axotomizados con reemplazo de NGF se pre-incubaron con BSA al 10% por 2 horas a temperatura ambiente, se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios contra el transportador vesicular VAcHT, el péptido

mENK o la proteína Syn (Tabla 4), después los cortes se lavaron dos veces con PBS-Tritón X-100 (PBS 0.1 M, Tritón X-100, 0.3%) y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente por 2 hrs. a temperatura ambiente. En el caso de VChT, éste se visualizó con Cy5, mientras mENK con isotiocianato de fluoresceína, FITC y Syn con Texas red, TxR en inmunohistoquímica triple. Una vez terminada la inmunodetección de las diferentes moléculas exploradas los tejidos se montaron con un medio que protege la fluorescencia (Dako Fluorescent Mounting Medium, Dako Cytomation, Denmark).

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para el inmunomarcaje *in situ*

Antisueros	Tipos de anticuerpos	Acoplados A	Diluciones	Compañías
Primario				
VChT	Cabra policlonal	---	1:100	Promega Corp. Madison, WI.
mENK	Conejo policlonal	---	1:100	Millipore. Billerica, MA.
Syn	Ratón policlonal	---	1:200	Dako Cytomation. Denmark.
NGF	Conejo policlonal	---	1:100	Millipore.
Secundario				
Anti-cabra IgG		Estreptavidina		
biotinilado	Caballo	Cy5	1:200	Zymed. San Francisco, CA.
Anti-conejo IgG	Burro	FITC	1:200	Jackson ImmunoResearch.
Anti-ratón IgG	Burro	Texas Red	1:200	Jackson ImmunoResearch

-Detección de NGF en GCS control axotomizados y axotomizados con reemplazo de NGF. Previo al proceso de inmunohistoquímica tratamos los cortes de GCS perfundidos a pH 3.0 con una solución de citratos al 2% (ImmunoDNA retrigger with citrate, Bio SB, Santa Barbara, CA) a baño maría a 70-80 °C durante 1 hora. Posteriormente los cortes se pre-incubaron con BSA 10% durante 2 h a temperatura ambiente, se incubaron toda la noche con un anticuerpo primario contra NGF (Tabla 4), se lavaron dos veces con PBS-Tritón X-100 (PBS 0.1 M, Tritón X-100, 0.3%) y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a FITC. Finalmente los cortes se montaron con el mismo medio usado en las laminillas del punto anterior.

-Captura digital de imágenes

Los triples marcajes se capturaron digitalmente en un microscopio confocal (LSM 510 Pascal Zeiss microscope) equipado con un láser de argón/kriptón con un objetivo 40X de inmersión de aceite (1.33 NA). Las imágenes se capturaron en tres longitudes de onda correspondientes para TxR (λ 594), FITC (λ 488) y Cy5 (λ 667), 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) con el software Metamorph (v.7.5.6; Universal Imaging Corporation, Molecular Devices; Downington, PA). Se analizaron 6 ganglios por cada condición experimental, se exploró un corte por ganglio y en cada corte se capturaron 16 imágenes, cuatro en cada una de las regiones en las que dividimos el ganglio: rostral, rostromedial, caudomedial y caudal. La determinación de la segregación en botones sinápticos fijados en tejido íntegro lo realizamos de manera similar al realizado en neuronas en cultivo.

Los datos obtenidos los expresamos como el promedio \pm SEM y los evaluamos estadísticamente con una prueba de ANOVA de 1 vía y posterior prueba de Tukey, considerándolos significativamente distintos si $p < 0.05$.

En el caso de inmunodetección de una sola marca (NGF) capturamos imágenes con un objetivo de 40X (1.33 NA) en un microscopio DSU (Disc scanning unit, Olympus BSX51WI), controlado por el software Stereo investigador (Micro Brighth Field Inc; Willinston, VT), con el filtro para FITC. Con el software Image J (NIH) determinamos la proporción de neuronas positivas a NGF en relación al total de neuronas analizadas; lo expresamos como el promedio del porcentaje de neuronas positivas a NGF \pm SEM. Evaluamos estadísticamente con la prueba *t*-student (Student's *t*-test) considerándolos significativamente distintos si $p < 0.05$.

RESULTADOS

I- Experimentos en cultivos celulares

-Los co-cultivos de neuronas-cardiomiocitos después de tres días expresan predominantemente inmunoreactividad a VMAT2 y NPY y escasa a VChT.

Los co-cultivos de neuronas simpáticas de ratas neonatas con miocitos cardiacos expresan inmunomarcadores de neurotransmisores y co-transmisores. En cultivos control de 3 días (NT 3d) la IR para VMAT2, VChT, NPY (figura 1) y el marcador de vesículas sinápticas SynI fue detectada en el citoplasma de los cuerpos celulares de las neuronas ganglionares, con gran intensidad en la región perinuclear. En los procesos axonales de estas neuronas observamos fluorescencia predominantemente para VMAT2 y NPY y escasa para VChT. Así mismo encontramos marca para SynI en una alta población de varicosidades, con lo cual confirmamos la naturaleza sináptica de los procesos neuronales.

Tomando en cuenta que las neuronas simpáticas ganglionares son predominantemente noradrenérgicas, no fue sorprendente detectar una amplia expresión de VMAT2 ($70.5\% \pm 3.0\%$ de las varicosidades sinápticas; fig. 1). Estas neuronas en cultivo también expresan, aunque en menor proporción, al marcador colinérgico VChT ($6.6\% \pm 0.5\%$ de las varicosidades sinápticas), como se había reportado previamente (Slonimsky *et al.*, 2003).

Además de los neurotransmisores colinérgico y noradrenérgico, estas neuronas presentan varicosidades positivas a NPY. Los miocitos cardiacos inmunodetectados mediante la proteína α -actinina no expresaron a los mensajeros químicos explorados y se encontró que estas células musculares están frecuentemente entremezcladas con las neuronas ganglionares en áreas con procesos neuríticos (Fig. 1).

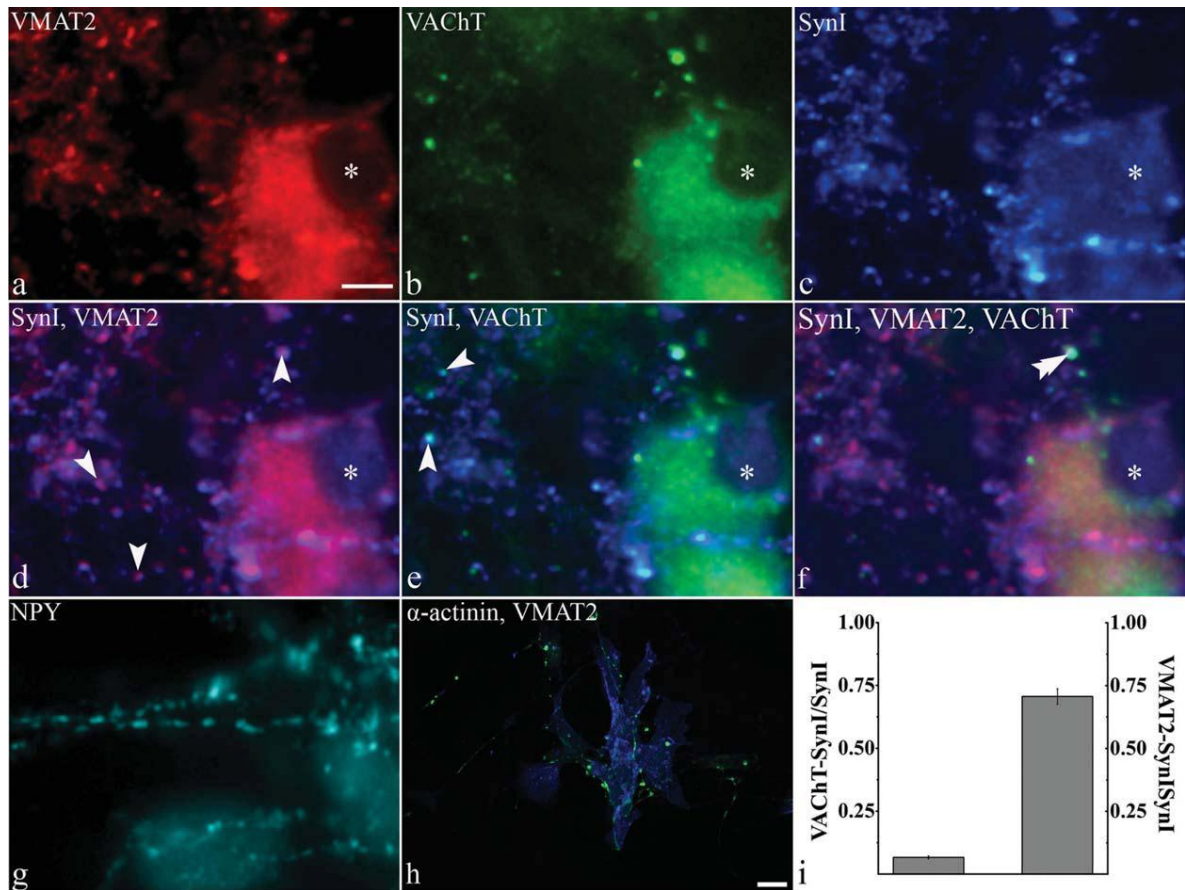


Fig. 1 Inmunoección de VMAT2, NPY, VAcHT, SynI, y α -actinina en co-cultivos de neuronas simpáticas ganglionares y miocitos cardiacos. Las neuronas muestran inmunoreactividad al marcador adrenérgico VMAT2 (a), al marcador colinérgico VAcHT (b), al marcador sináptico SynI (c). Se muestra en la combinación de imágenes SynI-VMAT2 (d), SynI-VAcHT (e) y SynI-VMAT2-VAcHT (f). En (d y e) se muestran varicosidades que contienen a SynI y a VMAT2 o a VAcHT, respectivamente (cabezas de flecha); (f) muestra una varicosidad que expresa a los tres marcadores (doble cabeza de flecha). Además de la expresión en botones, detectamos a VMAT2, SynI y VAcHT en los cuerpos celulares (marcados con * en la imagen). La expresión de VMAT2 y VAcHT se definió como el número de varicosidades positivas a SynI que expresan a VMAT2 o VAcHT dividido entre el número total de varicosidades IR a SynI (i); Razón de coexistencia de VAcHT y VMAT2 con SynI. (g) muestra el inmunomarcado del cotransmisor NPY en una serie de cultivos distinta a (a-e). (h) El doble inmunomarcado para la detección de la proteína muscular α -actinina y VMAT2 muestra la localización de los cardiomiocitos en una región alejada a los cuerpos celulares. Escala 10 μ m en (a-g), 20 μ m en (h).

-Neuronas en co-cultivo con cardiomiocitos de 3 días sin tratamiento muestran mayor segregación de VMAT2 o NPY de VACHT comparado con VMAT2 de NPY.

Para investigar la segregación de transmisores en las preparaciones NT 3d, exploramos el grado de co-expresión de VMAT2-NPY, VMAT2-VACHT y VACHT-NPY, tanto en cuerpos celulares como en botones sinápticos en cultivos que fueron procesados para la inmunodetección simultánea de los marcadores antes mencionados. En los cuerpos celulares siempre encontramos co-expresión de todos los marcadores analizados, lo cual nos sugiere que los somas contienen múltiples neurotransmisores. En contraste con los cuerpos celulares, las varicosidades muestran una segregación variable entre los distintos neurotransmisores. La segregación la definimos como el porcentaje de varicosidades o somas positivos a un marcador (p.e. NPY), negativos a otro segundo marcador (p.e. VMAT2). VMAT2 y NPY se segregan de las varicosidades positivas a VACHT en $42.7\% \pm 5.2\%$, y $79.2\% \pm 5.6\%$ respectivamente. La co-expresión de VMAT2, NPY y VACHT en cuerpos celulares en conjunto con la cantidad de localización independiente de estos marcadores en varicosidades separadas nos sugiere que las neuronas tienen la capacidad de segregar sus neurotransmisores hacia distintas varicosidades. A pesar de que estos resultados no distinguen entre segregación dentro de una neurita individual y segregación entre las distintas ramificaciones de una varicosidad, la co-localización de estos tres marcadores en los somas indica que los neurotransmisores están siendo diferencialmente transportados hacia los botones. En contraste con la extensa segregación de VMAT2 de VACHT y de NPY de VACHT, en estas condiciones de co-cultivo VMAT2 es segregado de NPY en solo el $16.3\% \pm 2.2\%$ de las varicosidades (Fig. 2).

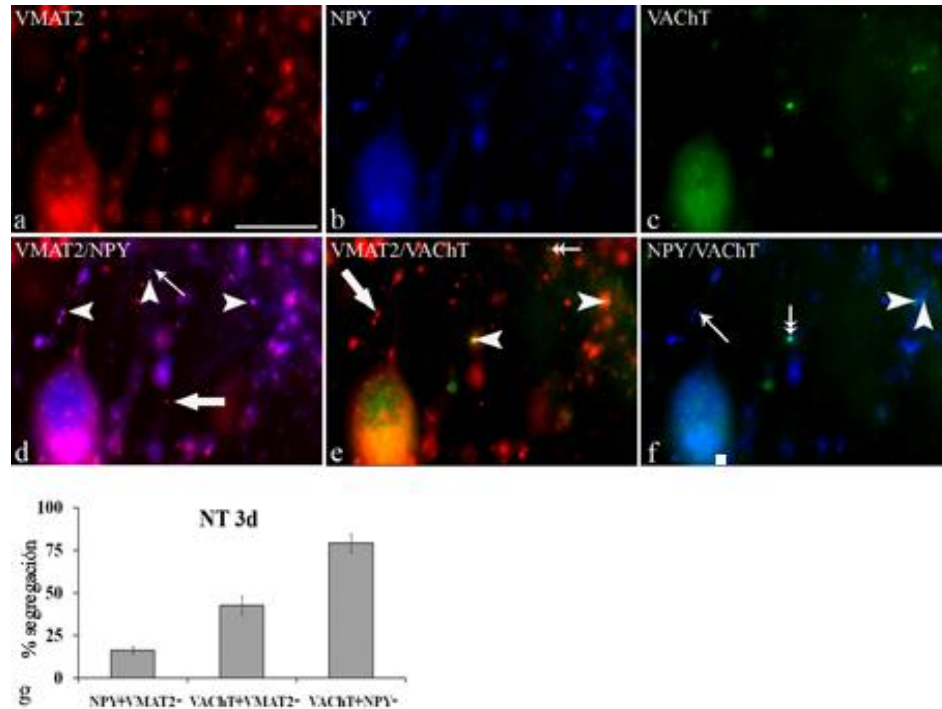


Figura 2.- Los marcadores para los transmisores clásicos VMAT2 y VACht y para el neuropéptido NPY son segregados hacia distintos botones sinápticos en co-cultivos de 3 días de neuronas ganglionares con miocitos cardiacos. Fotografías de la inmunodetección de VMAT2 (a), NPY (b) y VACht (c) en co-cultivos fijados tres días después de su siembra. Las imágenes combinadas (d-f) muestran la co-existencia de dos marcadores (cabezas de flechas), botones positivos solo a VMAT2 (flechas), botones positivos solo a NPY (flechas pequeñas) y a VACht (doble flecha). La gráfica en (g) muestra el porcentaje de segregación de cada relación analizada. Los datos muestran que hay poca segregación (alta co-existencia) de VMAT2 con NPY (d y g), y gran segregación de VACht respecto a VMAT2 y a NPY (e, f y g). Los cuerpos celulares siempre presentan una completa co-existencia de los marcadores analizados. Escala 50 μ m.

-El CNTF produjo en los co-cultivos de 3 días un aumento de segregación de VMAT2 de NPY, no modificó la de VMAT2 de VACht y disminuyó la de NPY de VACht. También incrementó el número de botones VACht positivos.

Examinamos el efecto del CNTF, un conocido factor de diferenciación colinérgico de neuronas simpáticas, en la segregación de VMAT2, VACht y NPY. El tratamiento a los co-cultivos por tres días con CNTF 10 ng/mL incrementó la segregación de VMAT2 de NPY de $16.3\% \pm 2.2\%$ a $35.9\% \pm 3.6\%$ comparado con la condición control ($p < 0.025$). Bajo las mismas condiciones, la segregación de NPY de VACht disminuyó de $79.2\% \pm 5.6\%$ a $59.6\% \pm 2.7\%$ ($p < 0.03$). No observamos efectos en la segregación de VMAT2 de VACht en esta condición (Fig. 3).

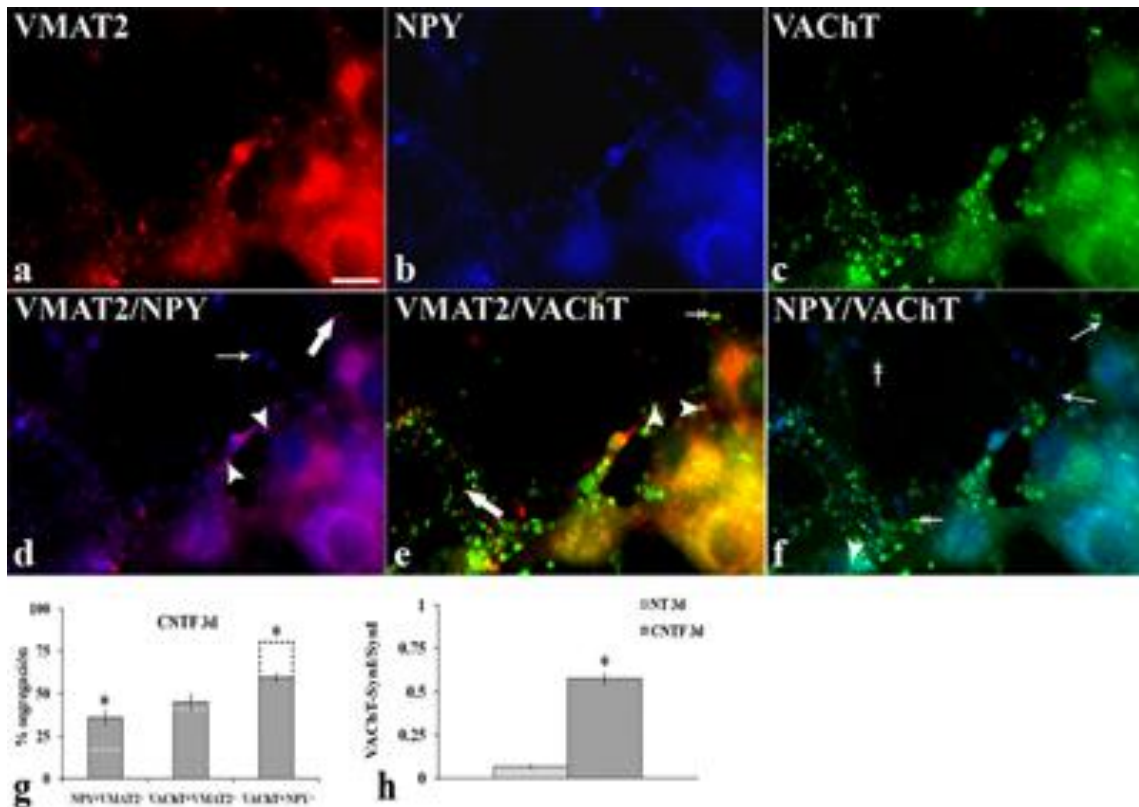


Figura 3.- Los co-cultivos de tres días crecidos en presencia de CNTF muestran un incremento en la segregación de VMAT2 de NPY, una disminución en la segregación de NPY de VACht así como un incremento en la expresión del marcador colinérgico en botones sinápticos. Fotografías del inmunomarcaje de VMAT2 (a), NPY (b) y VACht (c) en co-cultivos fijados tres días después de su siembra y que estuvieron en presencia de CNTF (CNTF 3d). Las imágenes combinadas (d-f) muestran la co-existencia de dos marcadores (cabezas de flechas), botones positivos solo a VMAT2 (flechas), botones positivos solo a NPY (flechas pequeñas) y a VACht (doble flecha). La gráfica en (g) muestra el porcentaje de segregación de cada relación analizada. Los datos muestran el porcentaje de segregación comparado con los valores NT 3d (líneas punteadas). Encontramos que el CNTF potencia la segregación de VMAT2 de los botones positivos a NPY (d y g). CNTF no afecta la segregación de VMAT2 de los botones positivos a VACht, mientras que reduce la segregación de NPY de los botones positivos a VACht (e, f y g). En contraste con la segregación en botones sinápticos inducida por el CNTF, este factor neurotrófico no modifica la co-expresión de los inmunomarcadores en los cuerpos celulares de las neuronas simpáticas ganglionares. CNTF también indujo un incremento en la expresión de varicosidades que expresan VACht (c y h). Escala 10 μ m.

La co-expresión VMAT2-NPY, VMAT2-VACht y NPY-VACht en el soma no se ve afectada por CNTF; todos los somas muestran completa co-expresión de marcadores. Confirmamos el efecto del CNTF como factor de diferenciación colinérgico al observar que el número de varicosidades que expresan VACht aumentó considerablemente respecto

a NT 3d ($6.6\% \pm 0.5\%$); encontramos que en presencia de CNTF el $57.4\% \pm 2.3\%$ de las varicosidades sinápticas son positivas a VACHT. A pesar del incremento de varicosidades positivas a VACHT, CNTF no afectó el nivel de segregación de VMAT2 respecto a VACHT. Cuando las neuronas crecieron en ausencia de miocitos cardiacos, el CNTF tuvo poco efecto en el número de varicosidades positivas a VACHT, lo cual nos sugiere que CNTF actúa sinérgicamente con otro factor producido por los cardiomiocitos o actúa directamente sobre ellos para inducir la liberación de un factor de diferenciación colinérgico. Esto es consistente con estudios previos que muestran que CNTF induce la expresión de marcadores colinérgicos después de tres días en co-cultivo (Slonimsky *et al.*, 2003) mientras que las neuronas cultivadas solas requieren siete días para la inducción de estos marcadores (Saadat and Rohrer, 1989).

-Los co-cultivos de tres semanas muestran una segregación aumentada de VMAT2 de NPY y NPY de VACHT. También muestran un incremento en la expresión de VACHT y disminución en la expresión de VMAT2.

Las neuronas simpáticas adquieren propiedades colinérgicas después de largos periodos de cultivo con cardiomiocitos, probablemente debido a la liberación de factores inhibidores de leucemia desde las células cardiacas (Yamamori *et al.*, 1989; Slonimsky *et al.*, 2003). Nosotros examinamos los efectos de períodos largos de cultivo en el patrón de segregación de neurotransmisores. Encontramos que un periodo de cultivo de 3 semanas (NT 3w) incrementa la segregación de VMAT2 de las varicosidades NPY positivas; de $16.3\% \pm 2.2\%$ (en NT 3d) a $59.4\% \pm 4.3\%$ ($p < 0.01$). El periodo prolongado de cultivo también incrementa la segregación de VMAT2 de VACHT (de $47.7\% \pm 5.2\%$ en NT 3d a $72.2\% \pm 3.2\%$ en NT 3w; $p < 0.01$). El análisis de la IR en los cuerpos celulares muestran que NT 3w no afecta la co-expresión de los marcadores analizados (Fig. 4).

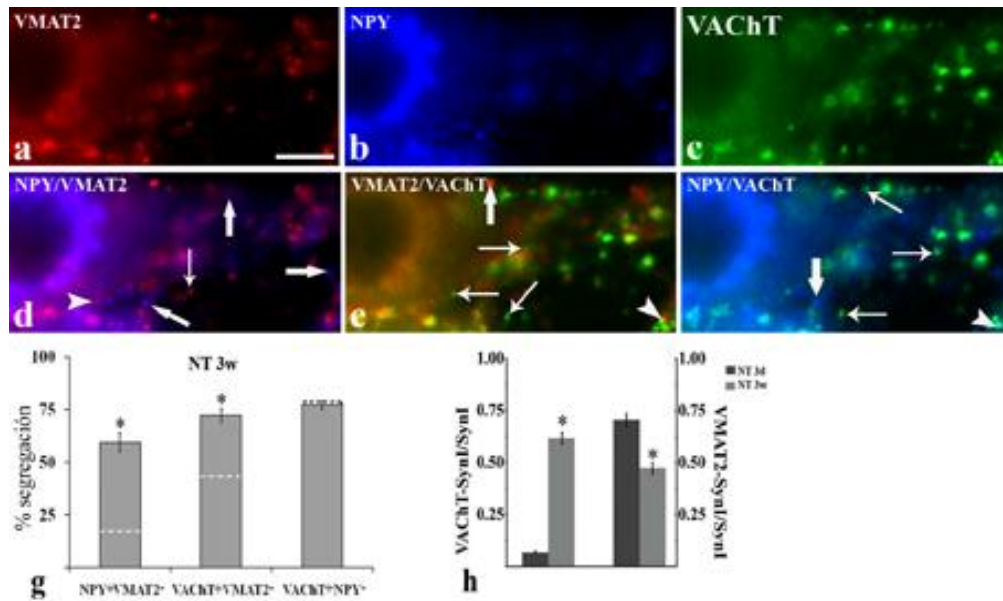


Figura 4.- El prolongar el cultivo hasta tres semanas aumenta la segregación de VMAT2, NPY y VACht. Adicionalmente, existe un incremento en la expresión de VACht y disminución de VMAT2 dependientes del tiempo de cultivo. Fotografías del inmunomarcaje de VMAT2 (a), NPY (b), y VACht (c) en co-cultivos fijados tres semanas después de su siembra (NT 3w). Las imágenes combinadas (d-f) muestran la co-existencia de los dos marcadores señalados (cabezas de flechas), botones positivos solo a VMAT2 (flechas), botones positivos solo a NPY (flechas pequeñas) y a VACht (doble flecha). La gráfica en (g) muestra el porcentaje de segregación comparado con NT 3d (líneas punteadas). Los datos muestran que un período prolongado de cultivo incrementa la segregación de VMAT2 de los botones positivos a NPY y de las varicosidades que contienen VACht mas no modifica la segregación de NPY de los botones positivos a VACht. Al igual que en NT 3d y CNTF 3d, el tiempo prolongado de cultivo no modifica la co-existencia de los marcadores en los somas. Al igual que la influencia del CNTF, el prolongar la vida de los co-cultivos hasta tres semanas aumenta el número de botones positivos a VACht y disminuye la cantidad de varicosidades que expresan VMAT2 (h). Escala 10 μ m.

Tres semanas en cultivo no afectó la segregación de NPY de las varicosidades que contienen VACht ($79.2\% \pm 5.6\%$ en NT 3d comparado con $77.1\% \pm 2.2\%$). Al igual que en CNTF 3d, NT 3w incrementa la expresión de VACht (detectamos VACht en el $61.6\% \pm 2.5\%$ de los botones sinápticos). El cambio de fenotipo adrenérgico a colinérgico entre los grupos NT 3d y NT 3w se observó no solo con el incremento de VACht, sino también en la disminución de VMAT2 el cual se redujo 33%, de $70.5\% \pm 3.0\%$ en NT 3d a $47.3\% \pm 2.6\%$ en NT 3w ($p < 0.01$; Fig. 4).

A continuación nos cuestionamos si los efectos tróficos del CNTF y de periodos prolongados de cultivo o bien la pérdida de células nerviosas en las preparaciones podría contribuir a los efectos sobre la segregación de neurotransmisores, por lo cual

cuantificamos el número de neuronas en todas las condiciones. No se encontraron diferencias en esta variable (NT 3d 14.1 ± 3.9 ; CNTF 3d 13.1 ± 2.0 ; NT 3w 13.9 ± 4.3 neuronas/ mm^2). Además, analizamos la morfología neuronal y encontramos una apariencia saludable en todas las condiciones analizadas lo cual nos sugiere que nuestros hallazgos no dependieron de los cambios en viabilidad y estado fisiológico de las neuronas después de un prolongado tiempo de cultivo o tratamiento con CNTF (Fig. 5).

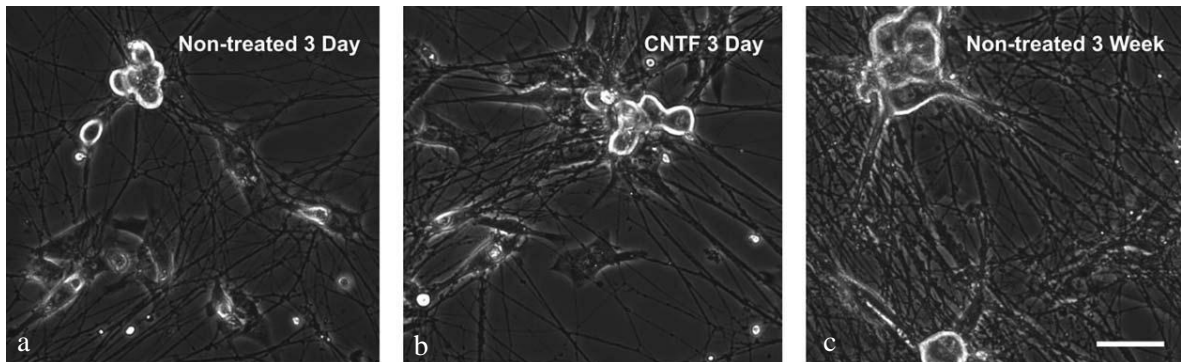


Fig. 5 imágenes de contraste de fase de neuronas simpáticas y cardiomiocitos. Las imágenes muestran células saludables con abundantes proyecciones neuríticas en todas las condiciones analizadas. Las neuronas son similares en morfología en NT 3d (a) y CNTF 3d (b). En NT 3w (c) las neuronas presentan somas y árboles neuríticos de mayor tamaño. Escala 50 μm .

-Las neuronas simpáticas en co-cultivo presentan dos tipos de varicosidades con distintos niveles de segregación de neurotransmisores.

En los cultivos NT 3d detectamos dos poblaciones de varicosidades que difieren en tamaño y contenido de neurotransmisor (i) varicosidades neuríticas o distales son aquellas localizadas en áreas ocupadas por neuritas y posiblemente próximas a miocitos, distantes $> 25 \mu\text{m}$ de cualquier cuerpo neuronal y (ii) varicosidades perisomáticas o próximas, localizadas en la proximidad $< 25 \mu\text{m}$ de los cuerpos neuronales. Las varicosidades neuríticas muestran menos segregación de algunos mensajeros químicos y se caracterizan por un menor tamaño ($1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$), mientras que las varicosidades perisomáticas son significativamente mayores ($2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}^2$; $p = 0.03$) y muestran una mayor proporción de segregación de neurotransmisores (del total de 1212 varicosidades analizadas 652 fueron perisomáticas y 560 neuríticas). Encontramos mas segregación de VMAT2 de NPY en las

varicosidades perisomáticas ($30.9\% \pm 5.9\%$ perisomáticas vs $1.7\% \pm 4.9\%$; $p < 0.01$), así como segregación de NPY de VAcHT ($56.4\% \pm 5.2\%$ perisomáticas vs. $29.0\% \pm 6.8\%$ neuríticas; $p = 0.03$). Por lo tanto, las varicosidades próximas a los cuerpos celulares neuronales muestran menor co-localización de VMAT2-NPY, VMAT2-VAcHT, y VAcHT- NPY que aquellas localizadas en procesos distales (Fig. 6).

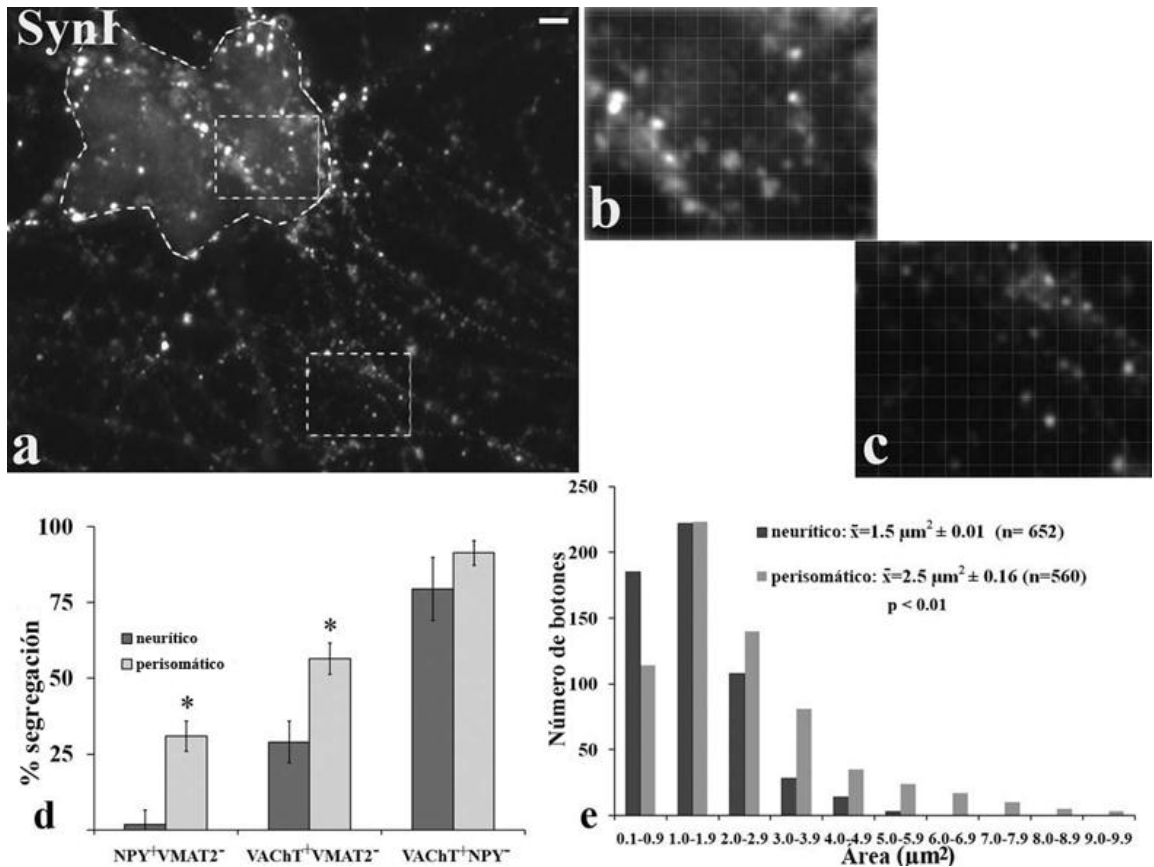


Figura 6.- Las neuronas simpáticas ganglionares presentan dos tipos de varicosidades. Fotografías de neuronas en co-cultivo marcadas para la detección de SynI. (a) muestra un grupo de cuerpos neuronales (delineado con línea punteada) y dos tipos de varicosidades (ampliaciones en b y c), unas grandes ($2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}^2$) cercanas a somas (b) y otras pequeñas ($1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$) localizadas a $25 \mu\text{m}$ o más de cualquier cuerpo celular (c). Las varicosidades cercanas a los somas muestran mayor segregación VMAT2 respecto a NPY y VAcHT (d). En (e) se muestra la incidencia de las varicosidades de acuerdo a su área, $p < 0.01$. Escala $10 \mu\text{m}$ en (a) y $2.5 \mu\text{m}$ en (b) y (c).

-Correlación funcional entre las propiedades de las varicosidades y la transmisión neuronal colinérgica

La mayor segregación de VMAT2 de VACHT en los botones cercanos a los somas, así como el incremento de VACHT y la disminución de la expresión de VMAT2 en los cultivos de 3 semanas nos sugieren que la transmisión en sinapsis neurona-neurona podría tender hacia la transmisión colinérgica en cultivos de mayor edad. Por explorar esta posibilidad, examinamos los efectos de neurotransmisores en sinapsis a través del registro electrofisiológico en célula completa (whole cell patch clamp) de la actividad espontánea. De manera consistente con nuestros resultados del incremento en la expresión de VACHT, encontramos que las neuronas de co-cultivos de 2-3 semanas de edad muestran actividad espontánea de naturaleza colinérgica (figura 7). Esta actividad espontánea es bloqueada por hexametonio (100 μ M; n=3) confirmando la naturaleza colinérgica de las sinapsis neurona-neurona. Las neuronas del grupo NT 3d (n=4) muestran poca, o ninguna actividad colinérgica espontánea (Fig. 7b), a pesar de que previamente se mostró que estos co-cultivos son capaces de formar sinapsis con los cardiomiocitos (Lockhart *et al.*, 1997). Este incremento de la transmisión colinérgica en NT 3w provee una correlación funcional del incremento de botones positivos a VACHT durante el mismo periodo de análisis.

Por otra parte, nosotros especulamos que cualquier actividad noradrenérgica en curso podría inhibir la transmisión colinérgica mediante la inhibición de la liberación del neurotransmisor por la activación de los α 2-autoreceptores (Vanhoutte and Shepherd, 1985; Kahan, 1987); sin embargo, el tratamiento de los cultivos con el inhibidor de estos receptores, la yohimbina (yoh; 1–10 μ M; n=8) no tiene efecto en el nivel de actividad colinérgica en cultivos de 11-18 días de edad (fig. 8), tiempo en el cual hay expresión de VMAT2 y VACHT.

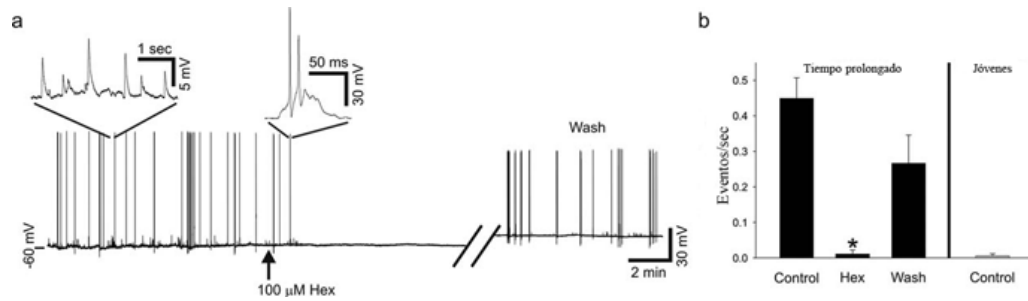


Figura 7.- El prolongar el tiempo de cultivo hasta tres semanas induce la actividad eléctrica espontánea de tipo colinérgico en neuronas ganglionares co-cultivadas con cardiomiocitos. (a) el registro intracelular del voltaje de neuronas de 23 días muestra espigas de potenciales de acción (ampliación superior derecha) y potenciales post-sinápticos excitatorios (ampliación superior izquierda) los cuales son bloqueados reversiblemente por el antagonista colinérgico nicotínico, hexametonio (100 μM), (b) la gráfica muestra el número de potenciales espontáneos por segundo; el hexametonio 100 μM disminuye reversiblemente la actividad espontánea en las neuronas cultivadas, $p=0.012$, prueba de t no pareada; $n=3$. Adicionalmente, los co-cultivos analizados tres días después de su siembra (cultivos jóvenes) muestran poca o nula actividad espontánea; $n=4$. Vacío de tiempo 15 min.

Confirmamos que la señalización noradrenérgica inhibe la actividad colinérgica espontánea, ya que la aplicación de NE (10-200 μM ; $n=8$), inhibe esta actividad. Esta inhibición es bloqueada con la aplicación de yohimbina ($n=4$). Lo anterior demuestra que la actividad espontánea en cultivos de mayor edad es mediada por una señalización colinérgica no noradrenérgica al tiempo en que la transmisión evocada a nivel de miocitos es completamente noradrenérgica (Slonimsky *et al.*, 2003).

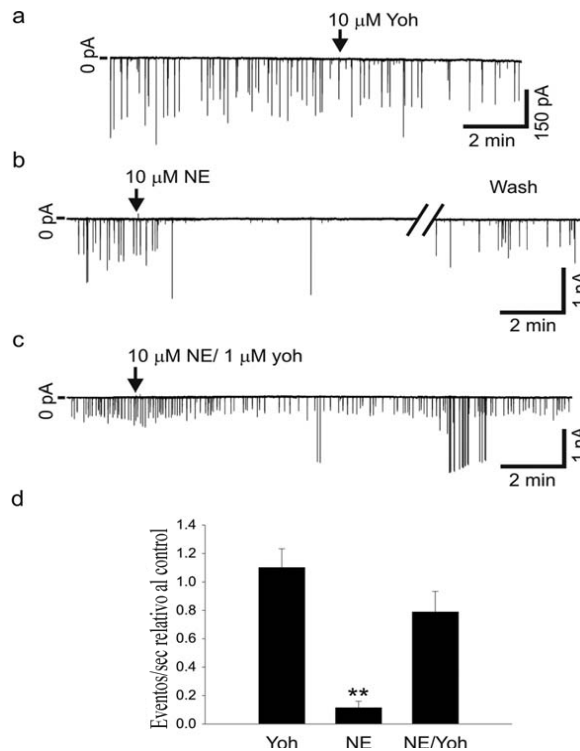


Figura 8.- La transmisión espontánea neurona-neurona en cultivo es predominantemente colinérgica y muestra poca o nula contribución noradrenérgica. (a) la aplicación del antagonista de los receptores α_2 -adrenérgicos, yoh no afecta la transmisión sináptica colinérgica (fijación de voltaje a -60 mV) en neuronas de 11 días en co-cultivo. (b) las neuronas en co-cultivo son sensibles a la inhibición por NE (fijación de voltaje a -50 mV); NE 10 μ M bloquea casi en su totalidad la actividad sináptica colinérgica de manera reversible, vacío de tiempo 10 min. (c) la NE bloquea la actividad colinérgica espontánea mediante su autoreceptor α_2 , la co-aplicación de yohimbina bloquea la inhibición mediada por NE de la actividad sináptica (fijación de voltaje a -50 mV). Las neuronas en (b) y (c) estuvieron en co-cultivo con cardiomiocitos durante 15 días previos a los registros. (d) muestra que yoh no tiene efecto en la actividad basal (n=8); sin embargo, NE bloquea significativamente la actividad colinérgica (n=3; p=0.003, prueba de *t* pareada). La co-aplicación de Yoh y NE bloquea esta inhibición, sugiriendo que el efecto de la NE exógena es regulado por el receptor α_2 .

El incremento en la transmisión colinérgica asociada con el incremento en el número de varicosidades inmunoreactivas a VACHT aunado a nuestros hallazgos sobre la existencia de una creciente población de botones sinápticos perisomáticos que contienen VACHT y carecen de VMAT2 nos sugieren que este incremento podría tener un papel en el establecimiento de las propiedades electrofisiológicas de este sistema.

II- Experimentos *in vivo*

En esta segunda parte de mi proyecto, estudiamos si los cambios en el entorno neural del GCS *in vivo* modulan la segregación de neurotransmisores en las terminales de las NPS. Para inducir cambios plásticos en el patrón de segregación de transmisores clásicos y co-transmisores de las NPS, axotomizamos (interrupción de la comunicación entre los somas y terminales axónicas) a las neuronas simpáticas del GCS, evento conocido por propiciar cambios en el fenotipo químico neuronal.

-La axotomía del GCS reduce la expresión de NGF en las neuronas post-ganglionares. La restitución de NGF previene esta reducción.

Con el propósito de confirmar que la axotomía de las neuronas ganglionares, por sección de los nervios postganglionares carotídeos interno y externo reduce la expresión de NGF en el GCS, por inmunohistoquímica exploramos la expresión de NGF en las neuronas ganglionares de ganglios íntegros, axotomizados y axotomizados con restitución de NGF.

En la condición control el $78.02\% \pm 1.92\%$ de los somas del GCS expresan NGF en su citoplasma (Fig. 9), la axotomía produce un 25% de reducción de estos valores, NGF se expresa en el $52.27\% \pm 1.29\%$ ($n=4$; $p < 0.01$); los ganglios axotomizados y axotomizados con restitución de NGF muestran un incremento significativo con respecto a los ganglios sólo axotomizados ($63.53\% \pm 2.88\%$, $n=4$; $p=0.01$; Fig. 9). Para descartar un sesgo por un probable aumento en la población total de neuronas ganglionares, determinamos si la axotomización sola o con NGF modifica el número total de células ganglionares. Ninguna de las dos condiciones analizadas modificó la población neuronal ganglionar.

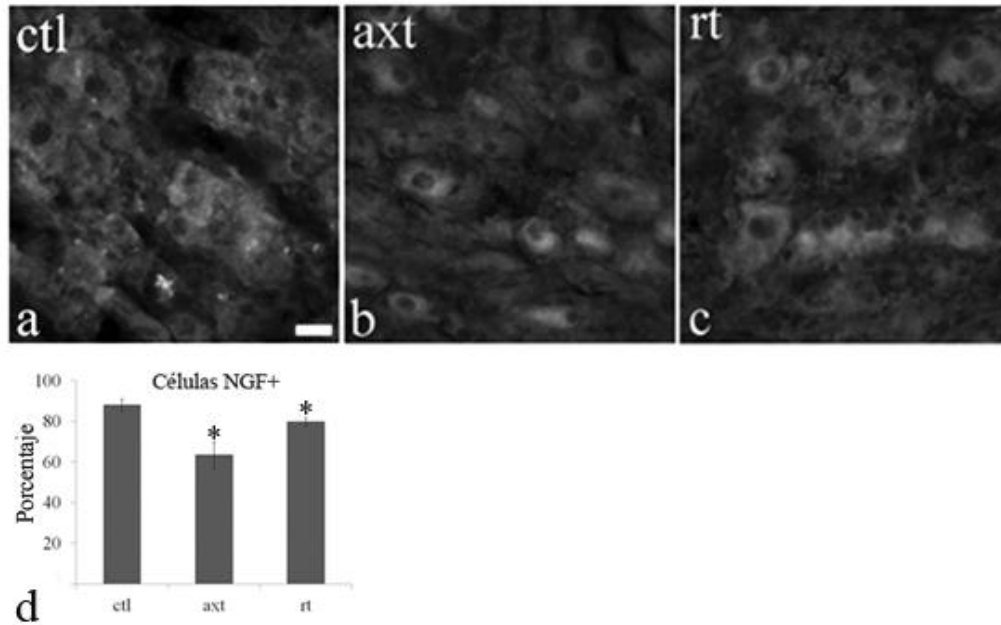


Figura 9.- Las neuronas simpáticas ganglionares axotomizadas presentan una reducción en la expresión de NGF; el NGF exógeno aplicado sobre el GCS aumenta la expresión de NGF con relación a la condición de axotomización. La expresión de NGF en los somas ganglionares axotomizados decae significativamente de $78.02\% \pm 1.92\%$ en ctl (a,d) a $52.27\% \pm 1.29\%$ ($n=4$; $p < 0.01$) en axt (b,d); la restitución de NGF en los ganglios axotomizados aumenta el porcentaje de neuronas positivas ($63.53\% \pm 2.88\%$, $n=4$; $p < 0.01$). Escala $20\mu\text{m}$.

-La axotomía del GCS incrementa la segregación de VAcHT de las varicosidades que contienen mENK. La restitución de NGF previene este aumento.

Analizamos la expresión del marcador para el neurotransmisor clásico ACh y para mENK. Como habíamos encontrado anteriormente (Sámano *et al.*, 2006) en ganglios control el VAcHT se segrega de una gran población de varicosidades positivas a mENK ($59.5\% \pm 2.7\%$; Fig. 10). La axotomía incrementa la presencia de botones que contienen al péptido co-transmisor estudiado y carecen del marcador colinérgico, es decir aumentan la segregación de $59.5\% \pm 2.7\%$ a $72.2\% \pm 1\%$; $p < 0.01$. La restitución de NGF (rt) restablece la proporción de botones positivos a mENK, negativos a VAcHT observados en los ganglios control. ($68.7\% \pm 1.3\%$ rt; $p > 0.05$ vs. Control; Fig. 10).

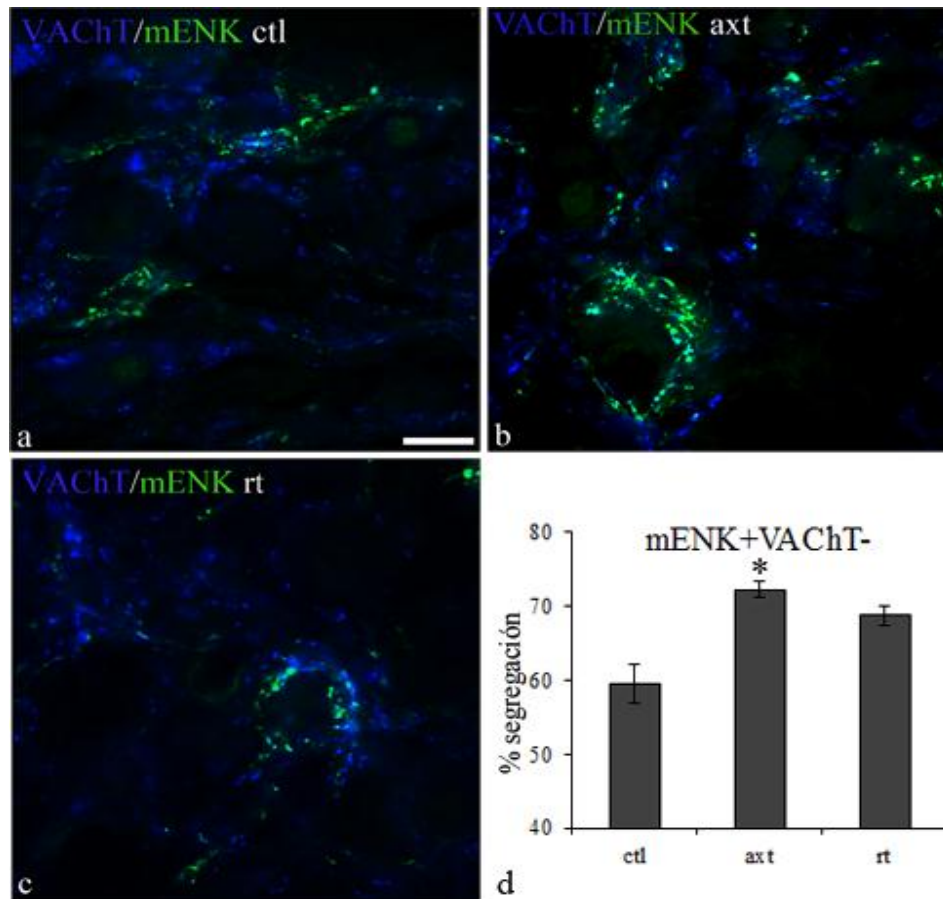


Figura 10.- La segregación de VACHT de los botones que expresan a mENK aumenta con la axotomía. El NGF exógeno revierte el efecto de la axotomía. Se muestran las micrografías de la inmunoreactividad a VACHT (azul) y mENK (verde) en las tres condiciones exploradas, ganglios control (a), axotomizados (b) y axotomizados mas restitución de NGF (c). En (d) se grafican los valores de segregación de VACHT de las varicosidades positivas a mENK, la segregación aumenta con la axotomización de $59.5\% \pm 2.7\%$ en ctl (a,d) a $72.2\% \pm 1\%$ en axt (b,d); $p < 0.01$; ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc de Tukey; la administración de NGF exógeno $25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ desde la placa de ELVAX® implantada concurrentemente a la lesión quirúrgica en GCS (rt; c,d) previene dicho aumento ($68.7\% \pm 1.3\%$). Escala $10 \mu\text{m}$.

La administración de NGF a ganglios no axotomizados no modifica la segregación de VACHT de los botones positivos a mENK.

Para determinar si la sola administración de NGF en ganglios intactos, pudiera tener un efecto sobre la axotomización, en un grupo experimental administramos NGF en ganglios no axotomizados. Encontramos que la aplicación de NGF en GCS intactos no modifica la proporción de botones mENK+ VACHT- respecto a la condición control (datos no mostrados).

La axotomía del GCS incrementa la proporción de varicosidades positivas a VChT, sin modificar la población Syn positiva. La restitución de NGF tiende a regresar a valores control el número de varicosidades VChT positivas.

En los GCS axotomizados 7 días antes, observamos un incremento en la proporción de botones positivos a VChT (figura 11). Mientras que en condiciones control las varicosidades positivas a VChT ocupan el $1.75\% \pm 0.09\%$ del total del área ocupada por cada imagen adquirida a 20X, la axotomía eleva esta proporción de varicosidades VChT⁺ a $2.28\% \pm 0.13\%$ ($p < 0.01$). Al administrar NGF al momento de la axotomización neutralizamos el efecto observado con la axotomía; los niveles de VChT en esta nueva condición no son estadísticamente distintos a la condición control ($1.69\% \pm 0.08\%$, $p > 0.05$; Fig. 11). Considerando este aumento en la proporción de varicosidades VChT⁺, nosotros esperábamos un aumento concomitante de la población de botones sinápticos positivos a Syn, sin embargo ni la axotomía sola o acompañada de NGF exógeno modifica la proporción de estos botones Syn⁺ ($2.28\% \pm 0.07\%$ en condición control vs. $2.02\% \pm 0.20\%$; Fig. 11).

A pesar de observar una tendencia a incrementar los valores de mENK, la axotomía no modifica estadísticamente la expresión de este neuropéptido ($0.52\% \pm 0.05\%$ en GCS control vs. $0.63\% \pm 0.05\%$ en GCS axotomizado).

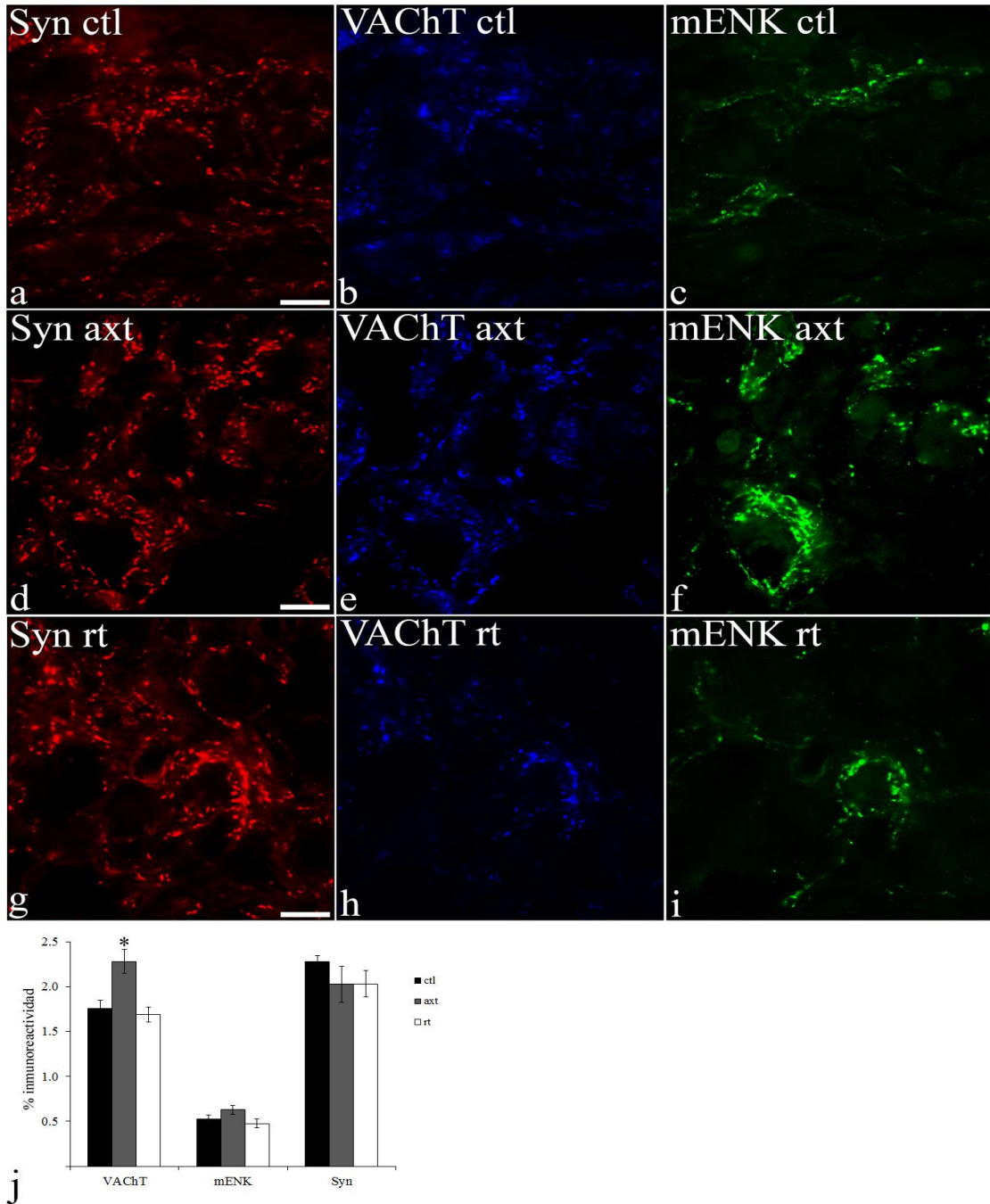


Fig.11 La axotomía de las neuronas ganglionares incrementa la expresión de VACHT y mENK en terminales axonales de neuronas preganglionares simpáticas. La axotomía promueve el aumento de la expresión de VACHT (b y e) y de mENK (c y f) mas no de Syn (a y d) la cual permaneció en su nivel basal. La administración de NGF exógeno durante el periodo de axotomía reduce la IR de todos los marcadores analizados (g-i). (j) representa el promedio \pm SEM de la IR de Syn, VACHT y mENK expresado en porcentaje por unidad de área en condición control (barras negras), axotomía (barras grises) y restitución de NGF 25 ng/ μ L (barras blancas). $p < 0.05$ prueba de t no pareada. Escala 20 μ m.

-La axotomía del GCS incrementa el número de varicosidades positivas a VACHT negativas al marcador de vesículas sinápticas, Syn.

Los datos de aumento de la población de varicosidades VACHT+ sin un correspondiente aumento en las Syn+ como resultado de la axotomización, nos llevó a preguntarnos si la nueva población de botones VACHT+ co-expresaban o no Syn. En condiciones control, como se esperaba, prácticamente el total de las varicosidades VACHT+ son también positivas a Syn ($99\% \pm 4.5\%$ de coexistencia; Fig. 12). La axotomía reduce la coexistencia ($74.6 \pm 5.2\%$; $p=0.01$) lo que se refleja en la emergencia de un 25.4% de botones colinérgicos que carecen de Syn. La restitución de NGF no logró revertir el efecto causado tras la axotomía (Fig. 12).

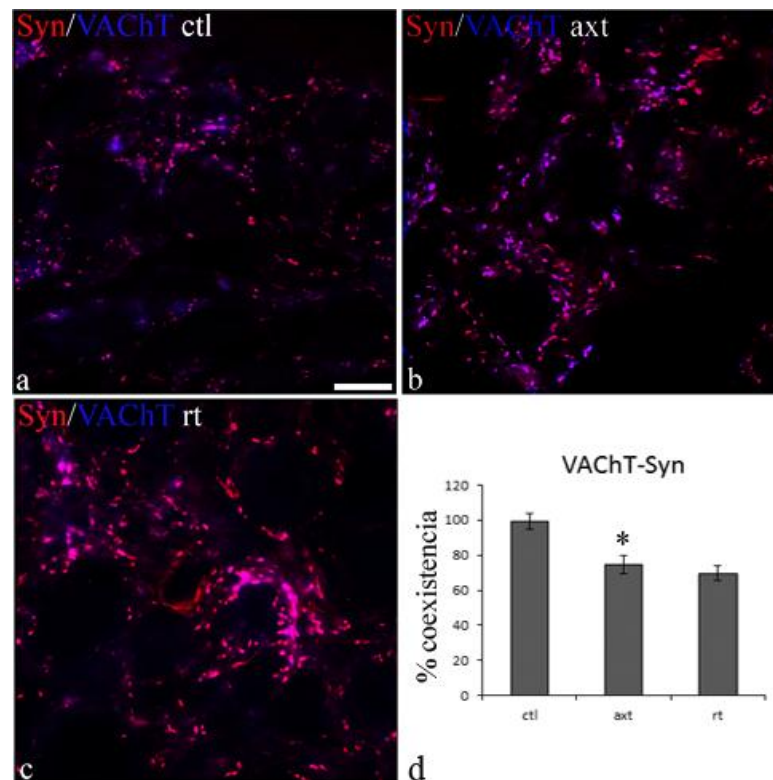


Figura 12.- La co-expresión de VACHT con Syn en las varicosidades de las NPS disminuye después de siete días de axotomía de las neuronas ganglionares. El porcentaje de botones que coexpresan VACHT (azul) y al marcador de vesículas sinápticas Syn (rojo) es menor en las varicosidades de ganglios axotomizados ($99\% \pm 4.5\%$ en ctl (a,d) $74.6\% \pm 5.2\%$ en axt (b,d). La administración de NGF exógeno (c) no tiene efecto sobre los componentes ganglionares axotomizados. En (d) se muestra la gráfica de los promedios \pm SnoEM de coexistencia VACHT-Syn en las tres condiciones experimentales exploradas (* = $p < 0.05$ ANOVA de 1 vía y prueba post-hoc Tukey). Escala 10 μ m.

La proporción de varicosidades que co-expresan Syn y mENK también disminuyó aproximadamente un 50%, no obstante que la proporción de varicosidades mENK+ no cambió. La restitución de NGF tampoco revirtió el efecto de la axotomización (Fig. 13).

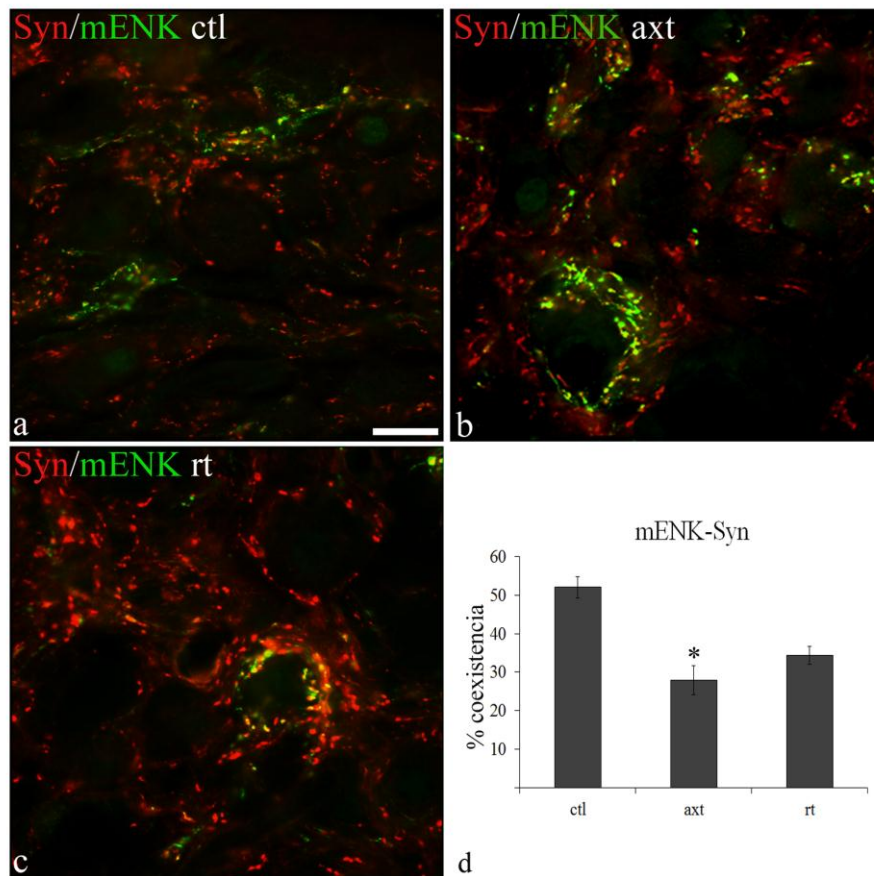


Figura 13.- La co-expresión de mENK con Syn disminuye significativamente después de siete días de axotomía del GCS. El porcentaje de varicosidades que contienen al péptido mENK y al marcador de vesículas sinápticas es menor en las terminales axonales presentes en GCS axotomizado (a), ($52\% \pm 2.8\%$ comparado con el control intacto (d) $27.91\% \pm 3.8\%$). La administración de NGF exógeno (c) no tiene efecto sobre los componentes ganglionares axotomizados ($34.4\% \pm 2.3$). En (d) se muestra la gráfica de los promedios \pm SEM de coexistencia mENK-Syn en las tres condiciones experimentales exploradas (* = $p < 0.05$ ANOVA de 1 vía y prueba post-hoc Tukey). Escala $10 \mu\text{m}$.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos tanto en neuronas ganglionares co-cultivadas con cardiomiocitos como en las NPS de ganglios intactos *in vivo*, revelan que la segregación de neurotransmisores en las neuronas simpáticas puede tener cambios plásticos. Los datos muestran también que las neuronas simpáticas además de segregar transmisores clásicos de los neuropéptidos, pueden segregar entre sí a los transmisores clásicos ACh y NA. Las neuronas modifican su segregación de neurotransmisores en respuesta a estímulos provenientes del entorno neuronal. La plasticidad de la segregación se encontró tanto en neuronas de animales recién nacidos como en individuos adultos.

En ambas poblaciones neuronas de ratas recién nacidas y adultas y condiciones estudiadas: neuronas ganglionares en cultivo y neuronas preganglionares en el animal intacto, el factor desencadenante de la plasticidad de la segregación de neurotransmisores fue la presencia o ausencia en el entorno de factores de crecimiento neuronal como el CNTF, BDNF y NGF.

Condiciones de neuronas en cultivo

Encontramos que al igual que en las NPS *in vivo* de animales adultos (Sámano *et al.*, 2006; Sámano *et al.*, 2009), las neuronas ganglionares de ratas neonatas en cultivo muestran segregación de sus mediadores sinápticos (Vega *et al.*, 2010). En nuestras condiciones control de 3 días las neuronas ganglionares co-cultivadas con cardiomiocitos expresan tanto en sus somas como en sus varicosidades preferentemente el marcador adrenérgico VMAT2, así como el cotransmisor peptidérgico NPY y escasamente, el marcador colinérgico VAcHT, en sólo 10% de la población total de varicosidades. Mientras que en los somas estos marcadores mostraron una completa co-expresión, en las varicosidades su expresión es independiente, lo que apoya la capacidad de segregación no solo de transmisores clásicos con co-transmisores sino también entre transmisores clásicos en estas neuronas ganglionares simpáticas. La segregación de transmisores clásicos ha sido descrita en el sistema nervioso central: dopamina y glutamato en neuronas mesencefálicas (Sulzer *et al.*, 1998; Sulzer and Rayport, 2000; Dal Bo *et al.*, 2008, Descarries *et al.*, 2008), de ACh y glutamato en motoneuronas espinales (Nishimaru *et al.*, 2005). En el ganglio simpático la segregación de transmisores clásicos ACh y NE fue sugerida por Landis

(1976) en preparaciones semejantes de co-cultivo de neuronas ganglionares y cardiomiocitos. En estudios de microscopía electrónica se encontró que las neuronas con fenotipo dual colinérgico/adrenérgico, contienen varicosidades que posiblemente almacenan un solo tipo de vesículas ya sea colinérgicas o adrenérgicas.

En la condición NT 3d, encontramos segregación significativa de VMAT2 y NPY de las varicosidades VAcHT+ con reducida segregación de VMAT2 de las varicosidades NPY+, menos del 20%. Esta reducida segregación de VMAT2 de las varicosidades positivas a NPY podría deberse al efecto promotor adrenérgico del NGF (Chun and Patterson., 1977; Lockhart *et al.*, 1997) adicionado al co-cultivo para favorecer la sobrevivencia celular, lo que explicaría el mayor nivel de coexistencia de VMAT2 con NPY.

La adición de CNTF en los co-cultivos de 3 días aumentó la segregación de VMAT2 de los botones NPY+ y redujo la de NPY de los VAcHT+. La prolongación del co-cultivo por 3 semanas aumentó la segregación de VMAT2 de ambas varicosidades: las NPY+ y las VAcHT+. Estos datos indican que CNTF y otros factores solubles producidos por las células no-neuronales del cultivo en 3 semanas modifican de manera diferente la segregación de transmisores. Se ha descrito que el fenotipo colinérgico es influenciado por los miocitos cardiacos (Patterson and Chun, 1977) y por otras células no neuronales (O'Lague *et al.*, 1978), por lo que también podría esperarse que cambien la segregación de transmisores.

De manera alternativa, las neuronas o las otras células del co-cultivo potencialmente podrían producir señales que modifiquen fenotipos y patrones de segregación. No podemos descartar la posibilidad de que la pérdida selectiva de neuronas o cambios en la población de miocitos durante el periodo de cultivo o la aplicación de CNTF podrían sesgar la expresión de neurotransmisores de las neuronas cultivadas. Sin embargo, la ausencia de pérdida neuronal y el soporte trófico proporcionado nos sugieren que nuestros resultados no fueron influenciados por cambios en la población neuronal.

Los factores ambientales no sólo regulan la expresión de transmisores sino también su localización subcelular. La expresión de marcadores colinérgicos, como la inducida en co-cultivos por CNTF que mostramos en este trabajo puede ser también inducida *in vivo* por factores solubles de señalización derivados del órgano blanco (Rao and Landis, 1990). Sin embargo estos factores de señalización pudieran también regular la localización intracelular de los transmisores. Por ejemplo CNTF, NGF y BDNF influyen en la distribución intracelular de VMAT2 y VACHT en las varicosidades, axones y somas de neuronas co-cultivadas con cardiomiocitos (Felder and Dechant, 2007). Estos autores sugieren que las neurotrofinas estudiadas aumentan la separación intra-varicosidad de estos transportadores vesiculares. Con base en nuestros resultados también facilitarían una segregación hacia varicosidades separadas.

Es posible que la heterogeneidad de la expresión de transmisores en diferentes botones ocurra como consecuencia del desarrollo del fenotipo colinérgico. Posiblemente la segregación ocurre durante un período transitorio entre el cambio de fenotipo de noradrenérgico a colinérgico, precisamente en el momento que las vesículas con VMAT2 empiezan a desaparecer de los botones VACHT+. Aunque es claro que las neuronas progresan hacia el fenotipo colinérgico, la segregación está presente desde los primeros días del cultivo, como mostramos en la condición de NT 3d. Esto nos sugiere que la segregación de transmisores es una propiedad general de las neuronas y no depende del proceso de cambio de fenotipo.

Mientras que el mecanismo de las neurotrofinas para inducir la segregación no se conoce, Felder y Dechant (2007) han especulado sobre un mecanismo de regulación de la fosforilación de los transportadores vesiculares como responsable de la distribución de transmisores. Así, en células de la línea PC12 la transferencia específica de VACHT a sus vesículas se interrumpe con la mutación de un residuo particular de serina, que se sabe es un blanco para la fosforilación por proteína cinasa C (Krantz *et al.*, 2000). En nuestra preparación es posible que CNTF actúe por medio de un mecanismo similar de fosforilación y altere el enrutamiento de VMAT2 hacia las varicosidades NPY+ o VACHT+.

Respecto a la presencia de 2 poblaciones de varicosidades de acuerdo a su cercanía a los cuerpos neuronales: unas denominadas neuríticas que se caracterizan por ser pequeñas ($1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$), distantes a los somas y probablemente haciendo sinapsis con los cardiomiocitos y otras mas grandes ($2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}^2$) y cercanas a cuerpos celulares, las perisomáticas que nosotros consideramos hacen sinapsis con dendritas proximales o cuerpos celulares. Shcherbakova *et al.* (2007), reportaron resultados similares de diferentes tamaños de varicosidades positivas a SynI en el mismo modelo de co-cultivo de neuronas ganglionares y cardiomiocitos. Estos autores encontraron hasta tres tamaños de varicosidades, y a las más pequeñas preferentemente contactando fibroblastos.

Las varicosidades perisomáticas muestran una mayor proporción de segregación de VMAT2 de botones NPY+ y VAcHT+, así como NPY de VAcHT+, que las varicosidades neuríticas, esto indica que gran parte de estas varicosidades perisomáticas expresan solo VAcHT. Estos resultados son consistentes con hallazgos previos de que neuronas ganglionares en cultivo forman sinapsis colinérgicas entre ellas (O'Lague *et al.*, 1974), mientras que mantienen conexiones noradrenérgicas sobre los miocitos (Yang, *et al.*, 2002). De acuerdo a la posibilidad de que las varicosidades perisomáticas sean en su mayoría colinérgicas, nuestros resultados electrofisiológicos mostraron que estas varicosidades establecen sinapsis neurona-neurona preferentemente colinérgicas. Es posible, por lo tanto que el efecto de factores producidos por neuronas podría promover el fenotipo colinérgico en las varicosidades perisomáticas, así como la segregación de los otros transmisores NA y NPY. Esta tendencia colinérgica de las sinapsis neurona-neurona, pudiera también interpretarse como una reproducción en cultivo de la sinapsis ganglionar colinérgica presente *in vivo* entre las NPS y las ganglionares. La menor segregación encontrada en las varicosidades neuríticas, indicaría que los efectos de los factores liberados por células no neuronales (miocitos, fibroblastos o microglía) podrían favorecer la coexistencia y liberación de mas de un neurotransmisor, favoreciendo una múltiple y diversa inervación al órgano blanco.

Condiciones de neuronas *in vivo*

Los resultados de los experimentos en neuronas simpáticas *in vivo* de ratas adultas muestran que, al igual que en cultivo, la segregación de transmisores como la ACh y la mENK presenta cambios plásticos como resultado de alteraciones en el entorno sináptico. Los cambios del entorno se produjeron con la axotomización de las neuronas ganglionares que cambiaron el contenido de neurotrofinas.

Recientemente se ha mostrado que los cambios en el contenido de NGF de las neuronas ganglionares inducido por la axotomización pueden producir modificaciones en la producción ganglionar de otra neurotrofina, el BDNF (Gannon *et al.*, 2012). Estos cambios en BDNF pueden a su vez modificar la distribución de neurotransmisores en las neuronas preganglionares (Causing *et al.*, 1997). De tal manera que los cambios plásticos en la segregación de transmisores en las neuronas preganglionares simpáticas pudieran deberse a que la axotomía al reducir el NGF, modifique el contenido del BDNF ganglionar, que por acción retrógrada afecte la distribución de neurotransmisores.

De acuerdo a nuestros resultados en cultivo donde CNTF produce cambios plásticos en la segregación de transmisores, exploramos si la administración exógena de las neurotrofinas NGF, BDNF o CNTF en el ganglio intacto *in situ* pudiera inducir cambios plásticos en la segregación. Nuestros resultados muestran que la administración de neurotrofinas no modifica la segregación, lo que pudiera explicarse por la dificultad en administrar la concentración requerida de neurotrofinas para inducir cambios. Nuestro siguiente intento fue explorar la reducción en el contenido de neurotrofinas, para ello usamos la axotomización, maniobra que finalmente produjo los cambios plásticos en el nivel de segregación del marcador colinérgico VAcHT de las varicosidades positivas a mENK. Una vez logrado el cambio en el contenido de NGF y en el nivel de segregación decidimos explorar si la administración exógena paralela a la axotomización prevenía ambos cambios. Encontramos que en efecto la restitución de NGF previene los cambios mencionados.

Adicionalmente a los cambios en la segregación encontramos que la axotomía aumenta el número de varicosidades positivas a VAcHT sin modificar las inmunoreactivas al

marcador sináptico, la Syn. Es decir que la axotomía induce la aparición de nuevas varicosidades colinérgicas (VAcHT+) que no expresan Syn. Al parecer la axotomía induce la aparición de un grupo de varicosidades con vesículas simpáticas inmaduras que aunque contengan VAcHT carecen de Syn. Al igual que con los cambios en la segregación la restitución exógena de NGF previene estos cambios.

La plasticidad de la segregación también se ha encontrado en terminales de neuronas de mesencéfalo en el *nucleus accumbens* en las cuales la segregación de dopamina y glutamato disminuye tras la administración de 6-OHDA (Dal Bo *et al.*, 2008).

Los mecanismos de la segregación de neurotransmisores así como el de su plasticidad permanecen aún sin ser dilucidados. Sin embargo, este trabajo basándose en la literatura y en nuestros resultados previamente mostrados propone los siguientes mecanismos, esquematizados en la figura 14:

Las neuronas sintetizan sus proteínas en la red del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi en los cuerpos celulares, luego a través de proteínas especializadas en transporte celular son distribuidas a las diferentes regiones subcelulares. Un ejemplo de transporte selectivo de diferentes proteínas neuronales fue reportado por Burack *et al.* (2000). Ellos encontraron una distribución polarizada de proteínas hacia dendritas o hacia axones en neuronas de hipocampo en cultivo que se lleva a cabo a través de diferentes mecanismos de transporte. Existen diversas interacciones de las proteínas cargo con sus proteínas transportadoras las cuales guían la dirección a seguir (Lee *et al.*, 2004; Prado and Prado, 2002; Reiterer *et al.*, 2008) hacia el destino final. De acuerdo a resultados encontrados en células ganglionares de retina proteínas radiomarcadas pueden ser distribuidas hacia axones o hacia terminales dependiendo del mecanismo de distribución diferencial adquirido en el Golgi (Mulugeta *et al.*, 2000). Se ha observado que vesículas sinápticas que son transportadas anterógradamente se detienen en sitios predefinidos donde emergerán procesos neuronales que eventualmente formaran sinapsis. En estos sitios las neuronas segregan las proteínas que residirán en los axones de las que seguirán hacia los botones presinápticos (Ahmari *et al.*, 2000; Sabo *et al.*, 2006). De hecho se han propuesto blancos

en la membrana presináptica, que a través de interacciones proteína-proteína atraen a las vesículas hacia la sinapsis durante la sinaptogénesis (Kee *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2009; Wang and Hsu, 2006). Nosotros proponemos que mecanismos similares de proteínas transportadoras con direccionalidad especificada desde su paso por el Golgi o proteínas de membrana con capacidad de atracción de proteínas relacionadas con la transmisión sináptica hacia los botones presinápticos pudieran ser los responsables de la segregación de transmisores hacia diferentes varicosidades en las neuronas simpáticas (Fig. 14).

Con relación al mecanismo de plasticidad de la segregación mediado por neurotrofinas proponemos que en las neuronas a través de señalización retrógrada, presumiblemente por medio de neurotrofinas pudieran influir los mecanismos de segregación propuestos en el párrafo anterior. En condiciones control, los órganos blanco ganglionares producirían NGF, las neuronas ganglionares lo endocitarían y transportarían hacia los somas, en los cuerpos celulares influirían sobre el aparato de Golgi para la síntesis de BDNF. Este BDNF a su vez sería liberado por las neuronas ganglionares, sería endocitado y transportado hacia los somas de las neuronas preganglionares lo que le permitiría modular la distribución de transmisores. La axotomía, al interrumpir el aporte de NGF hacia el Golgi de las neuronas ganglionares alteraría la síntesis de BDNF lo que redundaría en cambios en la distribución de los transmisores hacia las varicosidades de las neuronas preganglionares (Fig. 14).

Finalmente, una pregunta relevante relativa a la segregación por ser contestada es: ¿cuales serían las ventajas de las neuronas para en vez de co-almacenar y co-liberar sus transmisores desde los mismos botones presinápticos los almacene y libere diferencialmente desde distintos botones? Posiblemente una ventaja de la segregación sea disponer de un mecanismo más fácil para liberar distintos transmisores. La liberación diferencial de distintos transmisores co-almacenados en los mismos botones requiere de contar con múltiples mecanismos de liberación, esto pudiera ser evitado con el almacenamiento separado en diferentes botones. Otra ventaja, mencionada por Sossin *et al.*, 1990 es que la segregación ampliaría el ensamble de mecanismos requeridos para generar o mejorar las interacciones entre las neuronas, adicionalmente la habilidad de las neuronas para localizar moléculas selectivamente a diferentes procesos celulares le

permitiría modificar selectivamente botones presinápticos específicos durante experiencias plásticas neuronales. Con sus trabajos en retina, Duarte *et al.*, 1999 presentaron por primera vez evidencia de la relevancia funcional de la segregación. Estos autores encontraron que las células amacrinas al segregar ACh y GABA a diferentes terminales regulan la actividad de las neuronas ganglionares selectivamente en respuesta a un estímulo de luz que se mueve en diferentes regiones a través de la retina. Los movimientos en un sentido favorecen la liberación de los botones con ACh lo que induce el disparo de un tren de potenciales de acción; mientras que el movimiento en dirección opuesta activa a las terminales GABAérgicas con la consecuente disminución en el disparo de las neuronas ganglionares.

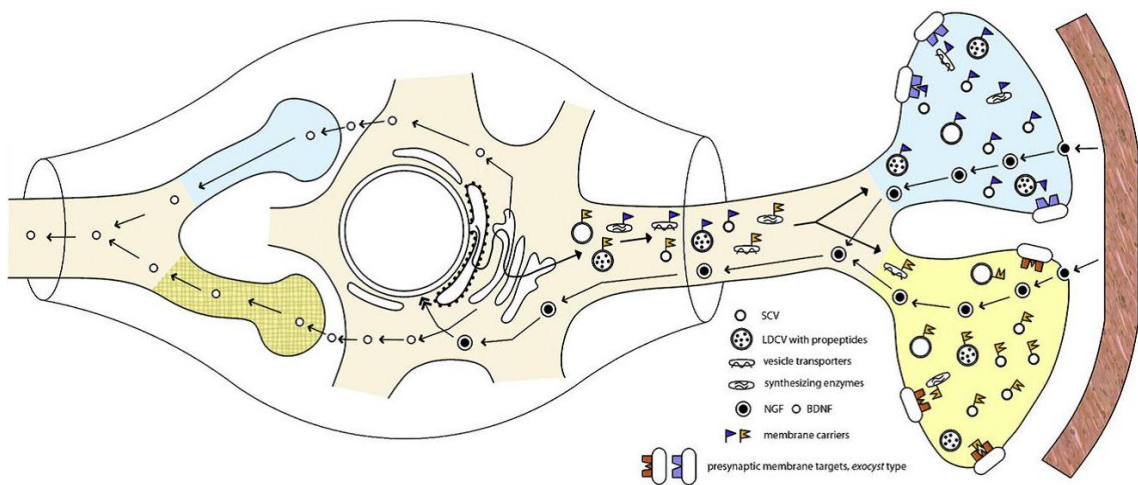


Fig. 14.- Esquemática de nuestra propuesta sobre la regulación de la plasticidad en la segregación de neurotransmisores clásicos y co-transmisores en neuronas simpáticas. La señalización por NGF derivado del blanco en las neuronas ganglionares influye en la distribución espacial de neurotransmisores, enzimas sintetizadoras o transportadores vesiculares en sus terminales axonales, también podrían favorecer la síntesis de BDNF el cual sería endocitado por la neurona presináptica como un mecanismo de regulación sináptico retrógrado. Estos procesos podrían estar regulados por secuencias de aminoácidos específicos en la membrana de las proteínas que distinguirían o serían reconocidas por señales exclusivas para cada subpoblación de botones sinápticos.

CONCLUSIONES

1. Las neuronas pueden distribuir o segregar sus transmisores hacia distintos botones presinápticos, lo que implica un reto a la versión moderna del Principio de Dale de que las neuronas liberan la misma combinación de transmisores desde todos sus procesos axonales.
2. Las neuronas simpáticas además de segregar a sus transmisores clásicos de sus co-transmisores tienen la capacidad de segregar transmisores clásicos.
3. Esta capacidad neuronal de segregación no es invariable y pre-definida, sino que es un propiedad plástica que puede ser modulada por el entorno sináptico, como puede ser la presencia o ausencia de neurotrofinas.
4. La segregación se logra por la acción de señales de distribución selectiva que suceden durante el transporte axonal. Algunas proteínas especializadas para transporte selectivo sintetizadas en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi o complejos de proteínas de membrana serían las encargadas de dirigir diferencialmente a los transmisores hacia las distintas varicosidades.

REFERENCIAS

- Adler JE, I. B. (1984). Plasticity of substance P in mature and aged sympathetic neurons in culture. *Science* 225(4669): 1499-1500.
- Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ. (2000). Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nature Neuroscience* 3: 445-451.
- Barañano DE, Ferris CD, Snyder SH. (2001). Atypical neural messengers. *Trends Neurosci.* 24(2): 99-106.
- Burack MA, Silverman MA, Banker G. (2000). The role of selective transport in neuronal protein sorting. *Neuron* 26: 465-472.
- Burnstock G. (1976). Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1(4): 239-248.
- Causing CG, Gloster A, Aloyz R, Bamji SX, Chang E, Fawcett J, Kuchel G, Miller FD. (1997). Synaptic innervation density is regulated by neuron-derived BDNF. *Neuron* 18(2): 257-267.
- Chun LL, Patterson H. (1977). Role of nerve growth factor in the development of rat sympathetic neurons in vitro III. Effect on acetylcholine production. *J. Cell Biol.* 75: 712-718.
- 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(1): 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 Research Reviews* 58: 290-302.
- Deutch AY, Roth RH (2004). Pharmacology and biochemistry of synaptic transmission: classic transmitter. From Molecules to Networks. An introduction to Cellular and Molecular Neuroscience. J. H. Byrne, Roberts, J.L. Amsterdam, Elsevier: 245-278.
- Duarte CB, Santos P, Carvalho AP. (1999). Corelease of two functionally opposite neurotransmitters by retinal amacrine cells: experimental evidence and functional significance. *J Neurosci Res.* 58(4): 475-479.
- Elfvin LG, Lindh B, Hökfelt T. (1993). The chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia. *Annu Rev Neurosci.* 16: 471-507.
- Ernsberger U, Rohrer H. (1999). Development of the cholinergic neurotransmitter phenotype in postganglionic sympathetic neurons. *Cell Tissue Res.* 297(3): 339-361.
- Felder E, Dechant G. (2007). Neurotrophic factors acutely alter the sorting of the vesicular acetylcholine transporter and the vesicular monoamine transporter 2 in bimodal sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci* 34(1): 1-9.
- Gannon SM, Walsh BF, Hawk K, Coulibaly AP, Isaacson LG. Investigation of uninjured sympathetic preganglionic neurons following axotomy of the superior cervical ganglion. Program 234.14. 2012 Neuroscience Meeting Planner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012. Online.
- Gibson SJ, Polak J, Bloom SR, Wall PD. (1981). The distribution of nine peptides in rat spinal cord with special emphasis on the substantia gelatinosa and on the area around the central canal (lamina X). *J Comp Neurol.* 201(1): 65-79.
- Gutiérrez R. (2005). The dual glutamatergic-GABAergic phenotype of hippocampal granule cells. *Trends Neurosci.* 28(6): 297-303.
- Gutiérrez R, Romo-Parra H, Maqueda J, Vivar C, Ramírez M, Morales MA, Lamas M. (2003). Plasticity of the GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the rat dentate gyrus. *J Neurosci.* 23(13): 5594-5598.
- Houser CR, Crawford G, Barber RP, Salvaterra PM, Vaughn JE. (1983). Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Res.* 266(1): 97-119.

- Jiménez B, Mora-Valladares E, Zetina ME, Morales MA. (2002). Occurrence, co-occurrence and topographic distribution of choline acetyl transferase, Met-enkephalin and neurotensin in the stellate ganglion of the cat. *Synapse* 43(3): 163-174.
- Jo YH, Schlichter R. (1999). Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci.* 2(3): 241-245.
- Joyce MP, Rayport S. (2000). Mesoaccumbens dopamine neuron synapses reconstructed in vitro are glutamatergic. *Neuroscience* 99(3): 445-456.
- Kahan
- Kee Y, Yoo J, Hazuka CD, Peterson KE, Hsu SC, Scheller RH. (1997). Subunit structure of the mammalian exocyst complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(26): 14438-14443.
- Krantz DE, Waites C, Oorschot V, Liu Y, Wilson RI, Tan PK, Klumperman J, Edwards RH. (2000). A phosphorylation site regulates sorting of the vesicular acetylcholine transporter to dense core vesicles. *J Cell Biol.* 149(2): 379-396.
- Lachmund A, Gehrke D, Kriegelstein K, Unsicker K. (1994). Trophic factors from chromaffin granules promote survival of peripheral and central nervous system neurons. *Neuroscience.* 62(2): 361-370.
- Landis SC. (1976). Rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures: correlation of the fine structure of endings with neurotransmitter function in single neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73: 4220-4224.
- Landis SC. (1983). Development of cholinergic sympathetic neurons: evidence for transmitter plasticity in vivo. *Fed Proc.* 42(6): 1633-1638.
- Landis SC, Keefe D. (1983). Evidence for neurotransmitter plasticity in vivo: developmental changes in properties of cholinergic sympathetic neurons. *Dev Biol* 98(2): 349-372.
- Landry M, Vila-Porcile E, Hökfelt T, Calas A. (2003). Differential routing of coexisting neuropeptides in vasopressin neurons. *Eur J Neurosci* 17(11): 579-589.
- Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R. (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20: 87-123.
- Lindh B, Staines W, Hökfelt T, Terenius L, Salvaterra PM. (1986). Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea pig autonomic ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83(14): 5316-5320.
- Llinás R, Sugimori M, Silver RB (1992). Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic nerve terminal. *Science* 256: 677-679.
- Lockhart ST, Turrigiano G, Birren SJ. (1997). Nerve growth factor modulates synaptic transmission between sympathetic neurons and cardiac myocytes. *J Neurosci* 17(24): 9573-9582.
- Lundberg J. (1996). Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev.* 48(1): 113-178.
- Lundberg JM, Anggård A, Fahrenkrug J, Hökfelt T, Mutt V. (1980). Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of coexisting transmitters for vasodilation and secretion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77(3): 1651-1655.
- Lundberg JM, Hökfelt T. (1986). Multiple co-existence of peptides and classical transmitters in peripheral autonomic and sensory neurons--functional and pharmacological implications. *Prog Brain Res* 68: 241-262.
- Mains RE, Cullen E, May V, Eipper BA. (1987). The role of secretory granules in peptide biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci.* 493: 278-291.
- Martin DP, Wallace TL, Johnson EM. (1990). Cytosine arabinoside kills postmitotic neurons in a fashion resembling trophic factor deprivation: evidence that a deoxycytidine-dependent

- process may be required for nerve growth factor signal transduction. *J. Neurosci.* 10(184-193).
- Merighi A. (2002). Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol.* 66(3): 161-190.
- Morales MA, Holmberg K, Xu ZQ, Cozzari C, Hartman BK, Emson P, Goldstein M, Elfvin LG, 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(25): 11819-11823.
- Mulugeta S, Ciavarrá RP, Maney RK, Tedeschi B. (2000). Three subpopulations of fast axonally transported retinal ganglion cell proteins are differentially trafficked in the rat optic pathway. *Journal of Neuroscience Research* 592: 247-258.
- Nicoll RA, Malenka R. (1998). A tale of two transmitters. *Science* 281(5375): 360-361.
- Nishimaru H, Restrepo C, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O. (2005). Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(14): 5245-5249.
- O'Lague PH, Obata K, Claude P, Furshpan EJ, Potter DD. (1974). Evidence for cholinergic synapses between dissociated rat sympathetic neurons in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA.* 71(9): 3602-3606.
- O'Lague PH, Potter DD, Furshpan EJ. (1978). Studies on rat sympathetic neurons developing in cell culture. III. Cholinergic transmission. *Dev Biol.* 67(2): 424-443.
- Patterson PH, Chun LL. (1977). The induction of acetylcholine synthesis in primary cultures of dissociated rat sympathetic neurons. I. Effects of conditioned medium. *Dev Biol.* 56(2): 263-280.
- Prado VF, Prado MA (2002). Signals involved in targeting membrane proteins to synaptic vesicles. *Cell Mol Neurobiol.* 22: 565-577.
- Rao MS, Landis S. (1990). Characterization of a target-derived neuronal cholinergic differentiation factor. *Neuron.* 5(6): 899-910.
- Rayport S. (2001). Glutamate is a cotransmitter in ventral midbrain dopamine neurons. *Parkinsonism Relat Disord.* 7(3): 261-264.
- Reiterer V, Maier S, Sitte HH, Kriz A, Rüegg MA, Hauri, HP, Freissmuth M, Farhan H. (2008). Sec24- and ARFGAP1-dependent trafficking of GABA transporter1 is a prerequisite for correct axonal targeting. *Journal of Neuroscience* 28: 12453-12464.
- Saadat S, Sendtner M, Rohrer H. (1989). Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. *J Cell Biology* 108(5): 1807-1816.
- Sabo SL, Gomes RA, McAllister AK. (2006). Formation of presynaptic terminals at predefined sites along axons. *J Neurosci* 26(10813-10825).
- Sámano C, Zetina ME, Cifuentes F, Morales MA. (2009). Segregation of met-enkephalin from vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in sympathetic preganglionic varicosities mostly lacking synaptophysin and synaptotagmin. *Science* 163(1): 180-189.
- Sámano C, Zetina 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(4): 295-306.
- Santos MS, Li H, Voglmaier SM. (2009). Synaptic vesicle protein trafficking at the glutamate synapse. *Neuroscience* 158(1): 189-203.
- Schuldiner S, Shirvan A, Linial M. (1995). Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiological reviews* 75(2): 369-392.
- Schultzberg M, Hökfelt T, Lundberg JM, Terenius L, Elfvin LG, Elde R. (1978). Enkephalin-like immunoreactivity in nerve terminals in sympathetic ganglia and adrenal medulla and in adrenal medullary gland cells. *Acta Physiol Scand.* 103(4): 475-477.

- Schultzberg M, Hökfelt T, Terenius L, Elfvin LG, Lundberg JM, Brandt J, Elde RP, Goldstein M. (1979). Enkephalin immunoreactive nerve fibres and cell bodies in sympathetic ganglia of the guinea-pig and rat. *Neuroscience* 4(2): 249-270.
- Shcherbakova OG, Hurt C, Xiang Y, Dell'Acqua ML, Zhang Q, Tsien RW, Kobilka BK. (2007). Organization of beta-adrenoceptor signaling compartments by sympathetic innervation of cardiac myocytes. *J Cell Biol*. 176(4): 521-533.
- Slonimsky JD, Yang B, Hinterneder JM, Nokes EB, Birren SJ. (2003). BDNF and CNTF regulate cholinergic properties of sympathetic neurons through independent mechanisms. *Mol Cell Neurosci*. 23(4): 648-660.
- Sossin WS, Sweet-Cordero A, Scheller RH. (1990). Dale's hypothesis revisited: different neuropeptides derived from a common prohormone are targeted to different processes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87(12): 4845-4848.
- Strand FL. Neuropeptides as neurotransmitters, neuromodulators, and neurohormones. En: *Neuropeptides, Regulators of physiological processes. Cellular and molecular neuroscience series*. 1999. MIT, pp 121-140.
- Sulzer D, Joyce M, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S. (1998). Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci*. 18(12): 4588-4602.
- Sulzer D, Rayport S. (2000). Dale's principle and glutamate corelease from ventral midbrain dopamine neurons. *Amino Acids* 19(1): 45-52.
- Trudeau LE, Gutiérrez R. (2007). On cotransmission & neurotransmitter phenotype plasticity. *Mol Interv*. 7(3): 138-146.
- Vanhoutte PM, Shepherd J. (1985). Adrenergic pharmacology of human and canine peripheral veins. *Fed Proc* 44(2): 337-340.
- Valenstein E. (2002). The Discovery of Chemical Neurotransmitters. *Brain Cogn* 49: 73-95.
- Vega A, Luther JA, Birren SJ, Morales MA. (2010). Segregation of the classical transmitters norepinephrine and acetylcholine and the neuropeptide Y in sympathetic neurons: modulation by ciliary neurotrophic factor or prolonged growth in culture. *Dev Neurobiol*. 70(14): 913-928.
- Verhage M, McMahon HT, Ghijsen WE, Boomsma F, Scholten G, Wiegant VM, Nicholls DG. (1991). Differential release of amino acids, neuropeptides, and catecholamines from isolated nerve terminals. *Neuron* 6(4): 517-524.
- Wang S, Hsu SC (2006). The molecular mechanisms of the mammalian exocyst complex in exocytosis. *Biochem Soc Trans* 34(687-690).
- Whittaker VP. What is Dale's principle? en: *Coexistence of neuroactive substances in neurons. Wiley series in neurobiology*, 1984. pp 137.
- Yamamori T, Fukada K, Aebersold R, Korsching S, Fann MJ, Patterson PH. (1989). The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* 246(4936): 1412-1416.
- 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(1): 158-164.
- Yang B, Slonimsky J, Birren SJ. (2002). A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nature Neurosci* 5(6): 539-545.
- Zhu PC, Thureson-Klein A, Klein RL. (1986). Exocytosis from large dense cored vesicles outside the active synaptic zones of terminals within the trigeminal subnucleus caudalis: a possible mechanism for neuropeptide release. *Neuroscience* 19(1): 43-54.

APÉNDICE I

-Artículo publicado.

Como resultado de los experimentos realizados para explorar el patrón de segregación de neurotransmisores en co-cultivos de neuronas simpáticas con miocitos cardíacos ante distintas condiciones ambientales del entorno sináptico se publicó el siguiente artículo:

Vega A, Luther JA, Birren SJ and Morales MA. Segregation of the Classical Transmitters Norepinephrine and Acetylcholine and the Neuropeptide Y in Sympathetic Neurons: Modulation by Ciliary Neurotrophic Factor or Prolonged Growth in Culture. *Developmental neurobiology*. 2010 Dec; 70 (14): 913-28.

Dichos experimentos fueron realizados en el laboratorio de la Dra. Susan J. Birren, en el departamento de biología del National Center for Behavioral Genomics de la Universidad Brandeis, localizada en Waltham, Massachusetts, EUA durante una estancia de investigación de Anabell Vega Espinoza.

Segregation of the Classical Transmitters Norepinephrine and Acetylcholine and the Neuropeptide Y in Sympathetic Neurons: Modulation by Ciliary Neurotrophic Factor or Prolonged Growth in Culture

A. Vega,¹ J.A. Luther,² S.J. Birren,² M.A. Morales¹

¹ Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México

² Department of Biology, National Center for Behavioral Genomics, Brandeis University, Waltham, Massachusetts 02454

Received 16 February 2010; revised 23 July 2010; accepted 3 August 2010

ABSTRACT: Recent evidence has demonstrated that cotransmission from mammalian neurons is not uniquely achieved by co-storage and corelease of transmitters and cotransmitters from single varicosities, but also by the concurrent release of mediators segregated in separate synapses of individual neurons. An important question to be addressed is whether neurons show defined patterns of segregation or whether this is a plastic feature. We addressed this question by exploring the segregation pattern of the classical sympathetic transmitters norepinephrine (NE) and acetylcholine (ACh) and the cotransmitter neuropeptide Y (NPY) in sympathetic ganglionic neurons cocultured with cardiac myocytes. Using antibodies against NPY and the vesicular NE and ACh transporters VMAT2 and vesicular acetylcholine transporter (VACHT), we investigated the effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) or long (three weeks) culture periods on the segregation of VMAT2, VACHT, and NPY in sepa-

rate varicosities. We found that although ganglionic neurons showed cell body coexpression of all the markers examined after three days, VMAT2 was segregated from VACHT in 43% of the VACHT-positive varicosities. In contrast, VMAT2 was only segregated from NPY in 16.3% of the NPY-positive varicosities. Cotransmitter segregation and VACHT expression was potentiated by both CNTF and longer times in culture. We also found two types of varicosities; one was smaller and located further from neuronal somata, and the other was larger, proximal to neuronal somata and had a higher level of segregation. These data demonstrate segregation of classical transmitters in sympathetic neurons and plasticity of neurotransmitter segregation. Finally, we discuss a possible functional correlate of segregation in sympathetic neurons. © 2010 Wiley Periodicals, Inc. *Dev Dyn* 239: 593–602, 2010

Keywords: cotransmission; synaptic plasticity; neurotrophins; myocytes; ganglion

Correspondence to: M.A. Morales (mamor@iib.unam.mx, mramor).

Contract grant sponsor: CONACYT (Mexico); contract grant number: 49807Q.

Contract grant sponsor: NIH; contract grant numbers: R01NS077305, R01HD042716, R01NS048713.

© 2010 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 16 August 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/dvdy.20834

INTRODUCTION

Most efferent sympathetic neuronal signals *in vivo* are conducted to their effectors by ganglionic neurons using norepinephrine (NE) as a classical transmitter and different neuropeptides as cotransmitters (Elfvén et al., 1993; Gibbins, 1995). Consequently, these neurons express the proteins necessary to produce and

use NE as a transmitter including the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in addition to neuropeptide Y (NPY; Romeo et al., 1994; Liu et al., 1996; Headley et al., 2007). However, sympathetic neurons demonstrate plasticity in regard to transmitter expression under certain circumstances. For example, sympathetic neurons innervating sweat glands *in vivo* and cultured sympathetic neurons can use the transmitter acetylcholine (ACh) as their main transmitter (Gaidry and Landis, 1998; Ernsberger and Rohrer, 1999; Francis and Landis, 1999). Furthermore, when neonatal sympathetic neurons are cocultured with target cardiac myocytes, they maintain their adrenergic phenotype, but also show cholinergic properties via expression of cholinergic synthetic enzymes and the vesicular acetylcholine transporter (VACHT; Potter et al., 1986; Slonimsky et al., 2003). The choice of neurotransmitter expression could have profound implications for functionality in neuronal systems, therefore understanding the mechanisms that control transmitter choice is crucial.

The idea that neurons co-store and corelease transmitters and cotransmitters at all varicosities throughout the neuronal arbor (Merighi, 2002; Yang et al., 2002; Barnstock, 2004) has been challenged by a growing body of evidence showing segregation of both classical transmitters or cotransmitters to separate synapses of individual neurons (Sossin et al., 1990; Eilist and Nathans, 1999; Sulzer et al., 1998; Sulzer and Rayport, 2000; Landry et al., 2003; Nishimura et al., 2005; Dai Bo et al., 2008; Descarries et al., 2008). We have shown evidence of segregation for the classical sympathetic transmitter ACh and cotransmitter neuropeptides to different boutons of sympathetic preganglionic neurons (Jiménez et al., 2002; Simano et al., 2006, 2007, 2009). Likewise, it has been reported that a population of varicosities of postganglionic sympathetic neurons that are positive for NPY do not express adrenergic markers, raising the possibility of differential routing or segregation of NE and NPY to distinct presynaptic boutons of ganglionic neurons (Heym et al., 1994).

Although cotransmission of two classical transmitters, NE and ACh, has been demonstrated in sympathetic neurons (Landis, 1976; Yang et al., 2002; Slonimsky et al., 2003; Felder and Dechant, 2007), and the presence of dual transmitter varicosities has been confirmed (Landis, 1976; Felder and Dechant, 2007), the possibility that these mediators can be segregated has not been ruled out. Moreover, considering the capability of these ganglionic neurons to switch phenotype, it is important to know whether neurons maintain a rigid pre-established route for delivery of different transmitters to separate varicosities or

whether segregation is a plastic neuronal feature that can be modulated or regulated by synaptic requirements. Vesicular transport proteins, which are responsible for moving specific transmitter molecules across the vesicular membrane, are known to be distributed heterogeneously in distinct pools of vesicles (Weihe et al., 1996; Liu and Edwards, 1997). Regulation of the location of transporter proteins to specific vesicle pools could be an important mechanism controlling transmitter segregation.

The aim of this work was therefore to examine if the classical sympathetic transmitters NE and ACh can be segregated to separate varicosities, and to investigate whether this segregation can be modulated by environmental conditions. To approach these questions, we examined the segregation patterns of the NE and ACh vesicular transporters VMAT2 and VACHT, and the cotransmitter NPY in sympathetic ganglionic neurons cocultured with cardiac myocytes. We took advantage of the known effects of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and long growth periods in promoting VACHT expression (Slonimsky et al., 2003) to investigate the effect of these treatments on the segregation of sympathetic transmitters and cotransmitters.

We found that sympathetic ganglionic neurons grown for three days showed significant segregation of VMAT2 and VACHT, with little segregation of VMAT2 and NPY, CNTF, and to a greater extent, a three-week culture period promoted segregation of these markers to separate boutons. We detected two types of varicosities in sympathetic ganglionic neurons cocultured with myocytes that may be associated with two different targets. Greater segregation was found in varicosities close to neuronal somata compared with those located distally to somata and potentially contacting myocytes. Preliminary accounts of these findings have been published in abstract form (Vega et al., 2008).

METHODS

Neonatal Sympathetic Neurons and Ventricular Myocytes

Cocultures of neonatal sympathetic neurons and cardiac ventricular myocytes were prepared and cultured essentially as described (Lothman et al., 2000) from Simonsen White or Sprague-Dawley rats (Simonsen Laboratories, Gilroy, CA, or Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Purified isolated sympathetic neurons (7500–15,000 neurons) were plated with cardiac myocytes (50,000 myocytes) obtained from the same animals and cultured for three days or three weeks before analysis. The cells were cultured in

Table 1 Antibodies Used for Immunofluorescence Labeling

Antisera	Type of Antibody	Coupled to	Dilution	Source
Primary				
VACHT	Guinea-pig polyclonal	—	1:1000	Neuromab, Davis, CA
VMAT2	Goat polyclonal	—	1:500	St. Cruz, St. Cruz, CA
Synapsin I	Rabbit polyclonal	—	1:500	Chemicon, Temecula, CA
NPY	Rabbit polyclonal	—	1:2000	Peninsula, San Carlos, CA
α -Actinin	Mouse monoclonal	—	1:200	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Secondary				
α Goat IgG	Donkey	FITC	1:400	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
α Guinea-pig IgG	Donkey	Rhodamine	1:400	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
α Rabbit IgG	Donkey	AMCA	1:200	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
α Mouse IgG	Donkey	CY5	1:200	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA

2X MAH food in the control condition (5 ng/ml, 2.5S NGF; Upstate Biotech, Lake Placid, NY) as described (Lockhart et al., 1997). After 1 day in culture 1 μ M cytosine arbutinamide (AraC; Sigma, St. Louis, MO) was added to the dishes to stop cell division. Where indicated, the medium was supplemented with 10 ng/ml CNTF (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Immunocytochemistry

Cultures were grown on glass-bottomed dishes (MatTek, Ashland, MA), maintained in culture for three days or three weeks, and then fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde. The cultures were permeabilized for 10 min with 0.1% Nonidet P-40 (Sigma) in PBS with 1% donkey serum. After rinsing with PBS, the cultures were blocked for 30 min in 10% donkey serum. Cells were incubated at 4°C overnight in primary antibodies diluted in PBS/1% donkey serum. Primary antibodies against VACHT, VMAT2, NPY, α -actinin, or synapsin I (SynI) were used (Table 1). The following day the cultures were washed and the primary antibodies detected using FITC-, Rhodamine-, CY5- or AMCA-conjugated secondary antibodies (Table 1). Stained cells were viewed using an Olympus IX-70 inverted fluorescent microscope fitted with fluorescein, rhodamine, CY5, and DAPI filters. Images were captured using an Orca-ER CCD digital camera (Hamamatsu, Japan) and Velocity software (Version 30.3; Perkin Elmer, Waltham, MA).

Electrophysiological Measurements

Cultured cells were visualized using an inverted Olympus IX-70 microscope with differential interference contrast (DIC) optics. The culture medium was washed out of the culture dish for 15 min prior to the start of each experiment. Current and voltage clamp recordings were made using an Axopatch 200B and analyzed using the pClamp 8 software suite (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), as described previously (Luther and Birnbaumer, 2006). Recordings were performed in external saline consisting in mM of: NaCl 150, KCl 3, MgCl₂ 2, Na HEPES 5, CaCl₂ 2, and dextrose 11; pH 7.4 and adjusted to 300 mOsmol with sucrose. Patch

electrodes (2–6 M Ω) were pulled from borosilicate glass (Waters Instruments Inc., Hamden, CT) on a Flaming/Brown horizontal micropipette puller, model P-97 (Sutter Instrument Co., Novato, CA). The pipette solution contained in mM: K gluconate 100, KCl 30, MgSO₄ 1, CaCl₂ 1, EGTA 10, HEPES 10, Na 3, and K₂ATP 2; pH 7.4 and adjusted to 300 mOsmol with sucrose. Noradrenergic (α) or cholinergic (nicotinic) transmission were blocked by the addition of 1–10 μ M yohimbine (Research Biochemical International, Natick, MA) or 300 μ M hexamethonium (Sigma, St. Louis, MO) to the bath solution, respectively. NE was applied in the bath at 10–200 μ M (Research Biochemical International, Natick, MA).

Data Analysis and Statistics

We examined neuronal transmitter expression after a three-day culture period and compared this with the expression in cultures grown either in the presence of CNTF 10 ng/ml for three days or in cocultures grown for three weeks. Five independent experiments were carried out for each time condition. The three conditions, non treated three days (NT 3d), CNTF three days (CNTF 3d), and non treated three weeks (NT 3w) were analyzed and compared. In each experiment, we analyzed immunoreactive puncta of eight randomly selected separate regions of the culture dish. Final experimental data shown is the mean of the values of the eight regions analyzed for each culture.

Using the Metamorph image analysis system (v. 7.5.6; Universal Imaging Corporation, Molecular Devices, Downingtown, PA), we applied the deconvolution function to enhance focus, and then we identified the specific immunofluorescence labels (in cell bodies and in varicosities) that were more intense than the background level (i.e., > mean +2 standard deviations). We assessed the number of overlapping pixels for each marker in single or double-labeled varicosities. Segregation of two labels was expressed as the percentage of varicosities expressing a given marker (e.g., VMAT2) that did not show staining for a second marker (e.g., NPY). Thus 100% segregation indicates that none of the varicosities in a double-labeled culture express both labels, whereas 0% denotes that all varicosities express both labels.

In some experiments, we costained the cultures for VMAT2, NPY, and VACHT to investigate the level of coexpression or segregation of each marker in individual puncta and cell somas. We chose to examine the segregation of VMAT2 from NPY, VMAT2 from VACHT, and NPY from VACHT. We expressed segregation of VMAT2 from NPY as the percentage of NPY-positive puncta that did not also express VMAT2. Segregation of VMAT2 from VACHT was expressed as the percentage of VACHT-positive puncta that did not also express VMAT2, and segregation of NPY from VACHT was expressed as the percentage of VACHT-positive puncta that did not also express NPY. These combinations were sufficient to demonstrate the regulatory control of transmitter segregation.

In a separate set of experiments, we stained the cultures for VMAT2, VACHT, and the synaptic marker Syn1. To assess the overall level of VMAT2 and VACHT expression, we quantified puncta expressing these markers as the percent of Syn1-containing varicosities positive for VMAT2 or VACHT. Additionally, we searched for possible differences in location, size, and transmitter content of immunoreactive puncta. Using the staining for Syn1, we classified two types of varicosities according to their distance from the neuronal somata: we defined puncta that appeared to make contact with a soma as "perisomatic", meaning that they were positioned to neuronal somata. "Neuritic" or distal varicosities were defined as being 25 μm or farther from any neuronal somata in the culture. This ensured that distal varicosities were not directly contacting a cell soma, but may be contacting either other neurites or myocytes. Areas of the varicosities were expressed in μm^2 . Finally, we separately assessed the segregation level in each type of varicosity. In total, we analyzed 1212 immunoreactive varicosities from five experiments. Data obtained from puncta of five experiments were expressed as the mean \pm SEM. Independent two-way ANOVA (two types of varicosities \times three conditions) followed by a *post-hoc* Fisher test were used. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Neuron-Myocyte Cocultures Predominately Express VMAT2 and NPY and Express Few VACHT Immunoreactive Puncta After Three Days in Culture

Rat neonatal sympathetic neurons were cocultured with cardiac myocytes in the control condition, fixed three days later (NT 3d), and stained for neurotransmitter and cotransmitter markers.

Immunoreactivity for the monoamine marker VMAT2, the cholinergic marker VACHT, the synaptic marker Syn1, and the NPY were detected in the cell bodies of ganglionic neurons, and immunolabeling was cytoplasmic with greater staining in the perinuclear region [Fig. 1(a-g)].

The neurons also showed puncta immunoreactive to VMAT2 and to VACHT [Fig. 1(a,b)]. The synaptic

marker Syn1, used to identify the synaptic nature of the neuronal process, was widely detected in almost the entire population of varicosities [Fig. 1(c)]. As expected in the predominantly noradrenergic sympathetic neurons, we detected extensive expression of VMAT2 [$70.5\% \pm 3.0\%$ of the Syn1-containing varicosities; Fig. 1(d,i)]. These neurons also express the cholinergic marker VACHT, albeit at a much lower level ($6.6\% \pm 0.5\%$) of Syn1 positive varicosities, as previously reported (Slovinitsky et al., 2003) [Fig. 1(e,i)]. In addition to cholinergic and noradrenergic neurotransmitters, these neurons also contain varicosities positive for NPY [Fig. 1(g)]. Cardiac myocytes immunodetected by the expression of protein α -actinin were negative to other markers explored and they were found intermingled with ganglionic neurons often in areas with neuritic processes [Fig. 1(h)].

Control Neuron-Myocyte Cocultures at Three Days Showed Greater Segregation of VMAT2 or NPY From VACHT, Compared With VMAT2 From NPY

To investigate transmitter segregation in NT 3d preparations, we explored the level of coexpression of VMAT2-NPY, VMAT2-VACHT and VACHT-NPY, both in cell bodies and in puncta in cultures that were triple-labeled for the three markers [Fig. 2(a-f)]. Cell bodies always showed coexpression of all pairs of markers examined, suggesting that all cells contained multiple neurotransmitters. In contrast to the cell somas, we found that varicosities showed variable segregation of the different neurotransmitters. Segregation was defined as the percentage of varicosities expressing one marker (e.g. VMAT2) that did not show staining for a second marker (e.g. NPY). The classical transmitter marker VMAT2 and the peptide NPY were segregated from VACHT in $42.7\% \pm 5.2\%$ and $79.2\% \pm 5.6\%$ of the VACHT-containing varicosities examined [Fig. 2(g-g)]. The coexpression of VMAT2, NPY, and VACHT in cell bodies in conjunction with the amount of independent localization of these markers in separated varicosities suggests that individual neurons actively segregate transmitters into separate varicosities. Although these results do not distinguish between segregation within individual neurites and segregation between varicosities in neurites that are fasciculated, the colocalization of all these markers in all cell somas demonstrates that synaptic markers are being differentially transported to selected boutons. In contrast to the extensive segregation of VMAT2 and NPY from VACHT, in these coculture conditions, VMAT2 was segregated from NPY in only $16.3\% \pm 2.2\%$ of the NPY-containing varicosities examined [Fig. 2(d,g)].

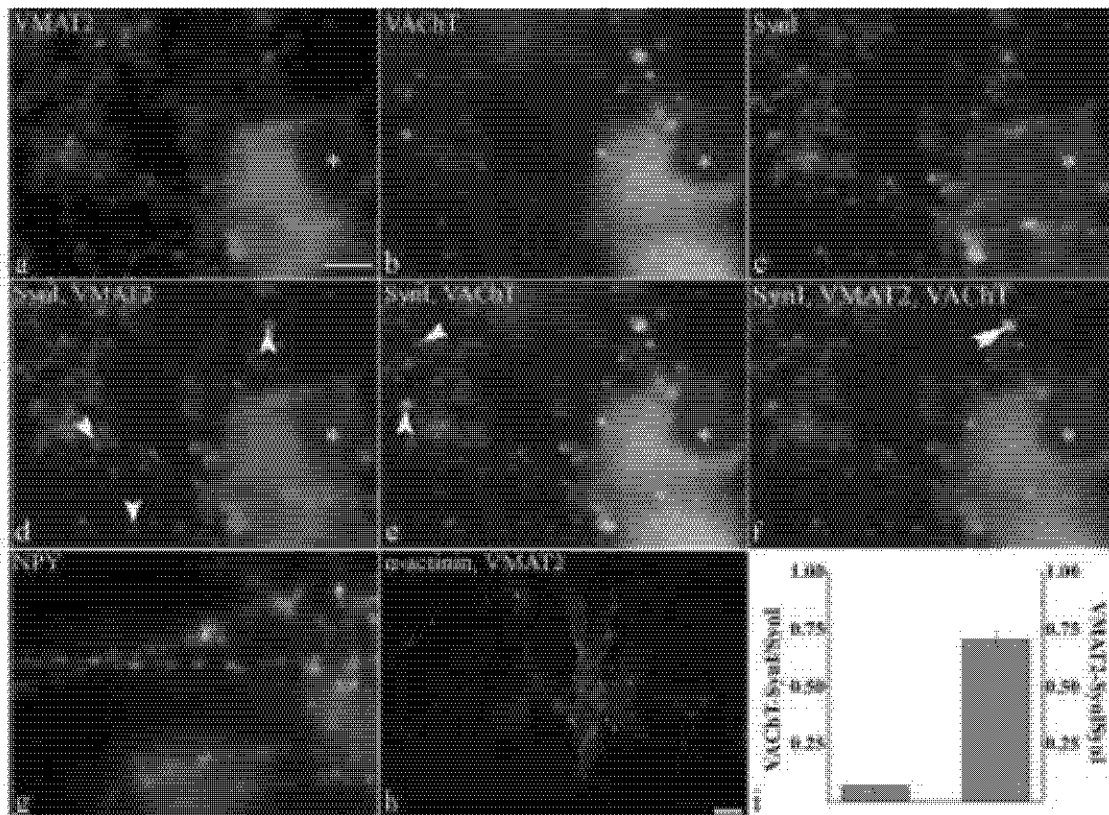


Figure 1. VMAT2, NPY, VACHT, Syn, and α -actinin are immunexpressed in three-day cocultures of sympathetic ganglionic neurons and myocytes. Micrographs of immunolabeling show that there was expression of the neurotransmitter markers VMAT2, VACHT, and NPY in cultured ganglionic neurons. Micrographs of immunolabeling for the adrenergic marker VMAT2 (a), the cholinergic marker VACHT (b), the synaptic marker Syn (c) and merged images for Syn, VMAT2 (d) for Syn, VACHT (e). A triple merged image for Syn, VMAT2, VACHT is shown in panel (f), illustrating the synaptic localization of these labels. Merged images Syn, VMAT2 (d) and Syn, VACHT (e) showed the Syn-containing varicosities expressing VMAT2 or VACHT (arrow heads). Syn, VMAT2, VACHT merge showed one varicosity expressing the three markers (double arrow head). In addition to the expression in puncta, VMAT2, NPY, and VACHT were also detected in cell bodies (* depict nucleus of the neurons). Expression of VMAT2 and VACHT was defined as the number of Syn positive varicosities cocexpressing VMAT2 or VACHT divided by the total number of Syn positive varicosities shown in the bar graph (i). Although VMAT2 was expressed in almost 75% of the Syn-containing varicosities, VACHT was observed in less than 10%. Immunolabeling for the cotransmitter NPY from a separate culture than shown in (a-c) (g). Double immunolabeling for the molecular protein marker α -actinin and VMAT2 showing location of synapses in the region of neurites distal to neuronal somata (h). Calibration: 10 μ m for a-g; 20 μ m for h.

Neurons and Myocytes Cocultured for Three Days in CNTF Showed Increased Segregation of VMAT2 From NPY, Decrease in NPY From VACHT, and Increased Expression of VACHT-Containing Boutons

We examined the effect of CNTF, a known cholinergic differentiation factor for sympathetic neurons on

the segregation of VMAT2, VACHT, and NPY (Fig. 3(a-f)). Treatment of neuron-myocyte cocultures for three days with 10 ng/ml CNTF increased the segregation of VMAT2 from NPY in NPY-containing varicosities from $35.3\% \pm 22\%$ in the control condition to $35.9\% \pm 3.6\%$ in the CNTF cultures ($p = 0.025$; Fig. 3(d,g)). Under the same conditions, segregation of NPY from VACHT in VACHT-containing varicosities

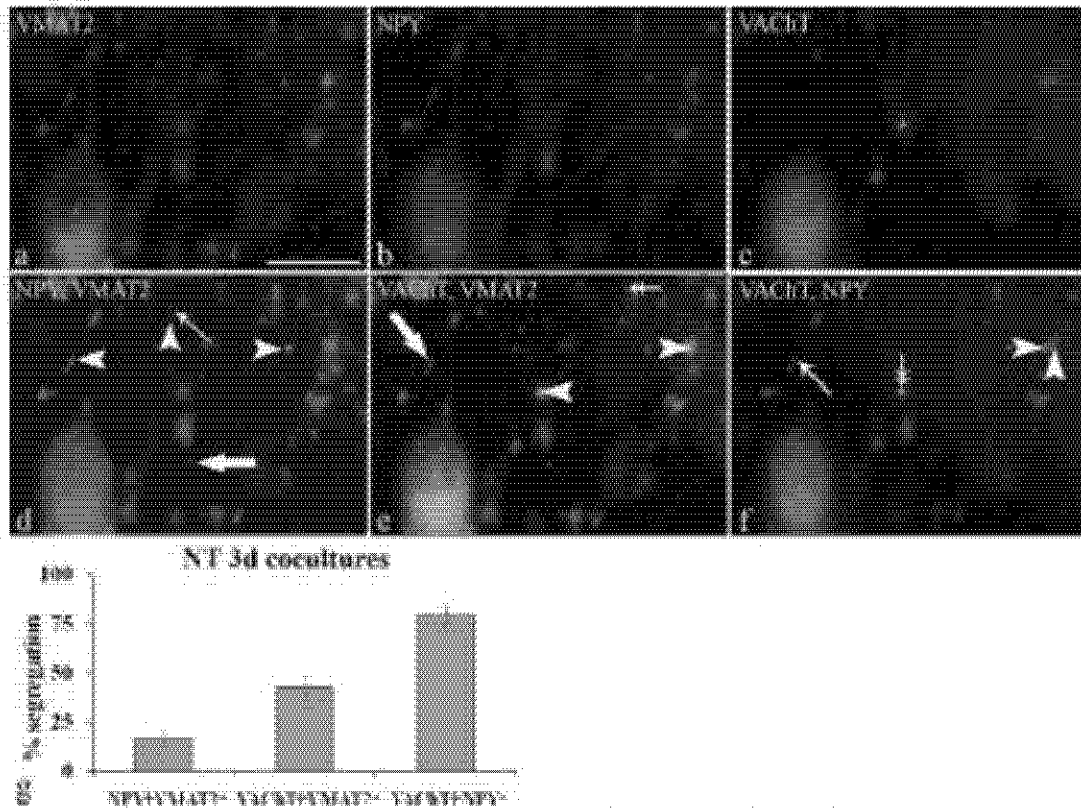


Figure 2. Markers for the two classical transmitters, VMAT2 and VACHT, and the neuropeptide, NPY, segregate to distinct varicosities in three-day cocultures of sympathetic neurons and cardiac myocytes. Although VMAT2 and NPY were more often coexpressed (i.e., showed less segregation), VMAT2 and NPY were more likely to be expressed in separate varicosities from VACHT. Micrographs of immunostaining for VMAT2 (a), NPY (b), and VACHT (c) in neuron–myocyte cocultures 3 d and at three days. The respective merged images (d–f) show coexistence of the two labels (arrow heads), VMAT2 only houses (arrows), NPY only houses (small arrows) and VACHT only houses (double arrows) labels. The graph in (g) shows the percent of segregation for each comparison. The data show that there is low segregation (high coexistence) of VMAT2 with NPY (d and g) and greater segregation of VMAT2 and NPY from VACHT (e, f and g). Cell bodies always showed complete coexistence of the markers examined (d–f). Calibration bar: 50 μ m.

ities decreased from $79.2\% \pm 5.6\%$ to $59.6\% \pm 2.7\%$ ($p = 0.03$; Fig. 3*(g)*). There was no effect of CNTF on the segregation of VACHT and VMAT2 (Fig. 3*(a,g)*). Cell body coexpression of VMAT2 and NPY or NPY and VACHT was not affected by CNTF, with all of the cell bodies showing complete expression of all markers (Fig. 3). We confirmed the effect of CNTF in promoting an overall increase in the number of varicosities expressing VACHT. We found an increase from $6.6\% \pm 0.5\%$ of the Synt1-positive varicosities expressing VACHT in NT 3d to $57.4\% \pm 2.3\%$ with CNTF treatment (Fig. 3*(c,h)*). Despite this increase in the number of VACHT-containing vari-

cosities, CNTF did not affect the extent of segregation of VMAT2 from VACHT (Fig. 3*(e–g)*). Interestingly, when the sympathetic neurons were grown in the absence of cocultured myocytes, we found that CNTF had little effect on the numbers of VACHT-positive varicosities (data not shown), suggesting either that CNTF acts synergistically with another factor produced by myocytes or acts on the myocytes to induce release of a cholinergic differentiation factor. This is consistent with previous studies showing that CNTF robustly induced cholinergic markers after three days in myocyte cocultures (Slonimsky et al., 2003), whereas neurons grown alone required seven

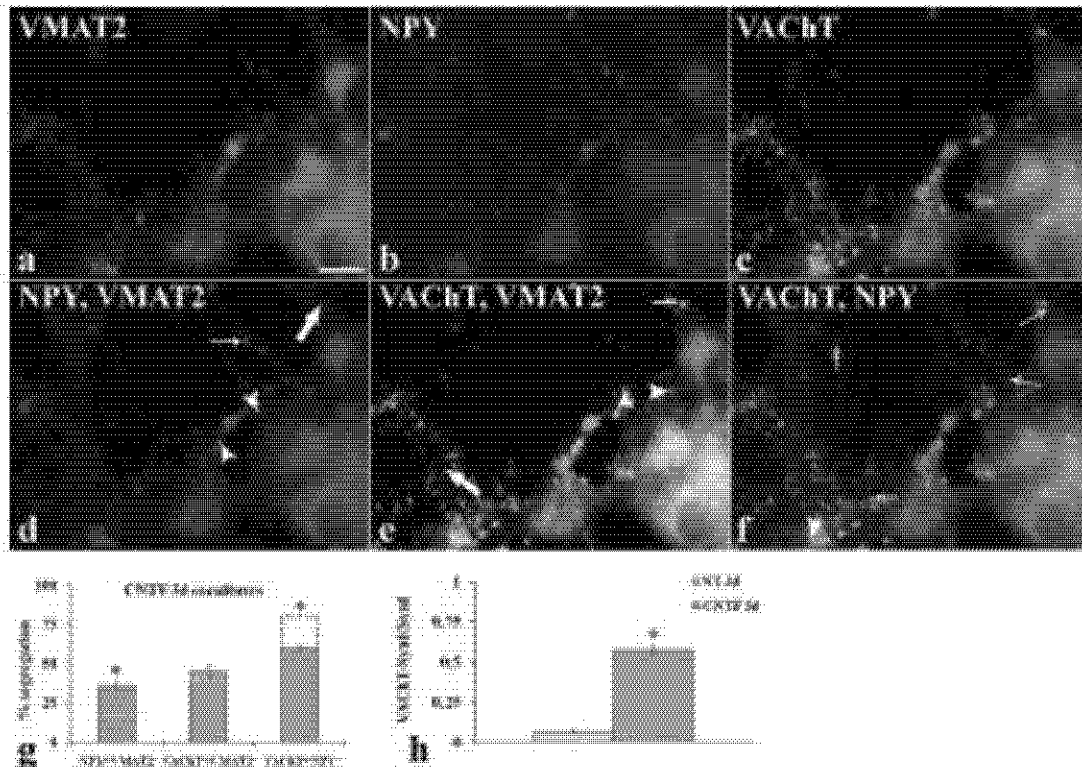


Figure 3. Culture in the presence of CNTF for three days potentiated segregation of VMAT2 from NPY, decreased segregation of NPY from VACHT, and increased the number of VACHT-containing boutons. Micrographs of immunostaining for VMAT2 (a), NPY (b), and VACHT (c) in neuromuscular junctions grown with CNTF and fixed at three days. The merged images: VMAT2, NPY (d), VMAT2, VACHT (e), and VACHT, NPY (f) show coexpression (arrow heads), VMAT2 (arrows), NPY (small arrows), and VACHT (double arrows) labels. The graph (g) shows the percent of segregation compared with NT 3d values. Horizontal marks. It can be seen that CNTF facilitated segregation of VMAT2 from NPY, 59.4% ± 4.3% compared with 16.3% ± 2.2% in NT 3d group (d and g). CNTF did not affect segregation of VMAT2 from VACHT and reduced segregation of NPY from VACHT, 72.2% ± 3.2% in NT 3d group to 50.6% ± 1.7% (e, f and g). In contrast to the segregation induced by CNTF in puncta, the neurotrophic factor did not alter the full compression of all markers in cell bodies. There was also a clear increase in the expression of VACHT-containing varicosities from 6.6% ± 0.9% in NT 3d to 51.4% ± 1.3% with CNTF (c and h). Calibration: 30 μm.

days for induction of cholinergic markers (Saeed et al., 1989).

Three Weeks of Culture Enhanced Segregation of VMAT2 From NPY and VACHT and Increased VACHT Expression While Reducing VMAT2 Expression

Sympathetic neurons have also been reported to acquire cholinergic properties following long periods of culture with cardiac myocytes presumably because of release of leukemia inhibitory factor from the latter (Yamamoto et al., 1989; Slonimsky et al., 2003). We therefore examined the effects of long oculture peri-

ods on the segregation of transmitter markers (Fig. 4(a-c)). We found that a three-week culture period increased the segregation of VMAT2 from NPY in NPY-containing varicosities compared with cultures grown for three days: from 16.3% ± 2.2% segregation in NT 3d to 59.4% ± 4.3% in NT 3w ($p < 0.01$; Fig. 4(d,g)). The longer culture period also increased segregation of VMAT2 from VACHT in VACHT-containing varicosities [from 47.7% ± 5.2% in NT 3d to 72.2% ± 3.2% at three weeks; $p < 0.01$; Fig. 4(e,g)]. Examination of cell body staining showed that the three-week culture time did not affect the complete compression in cell bodies (Fig. 4). Three weeks in culture did not affect segregation of NPY from

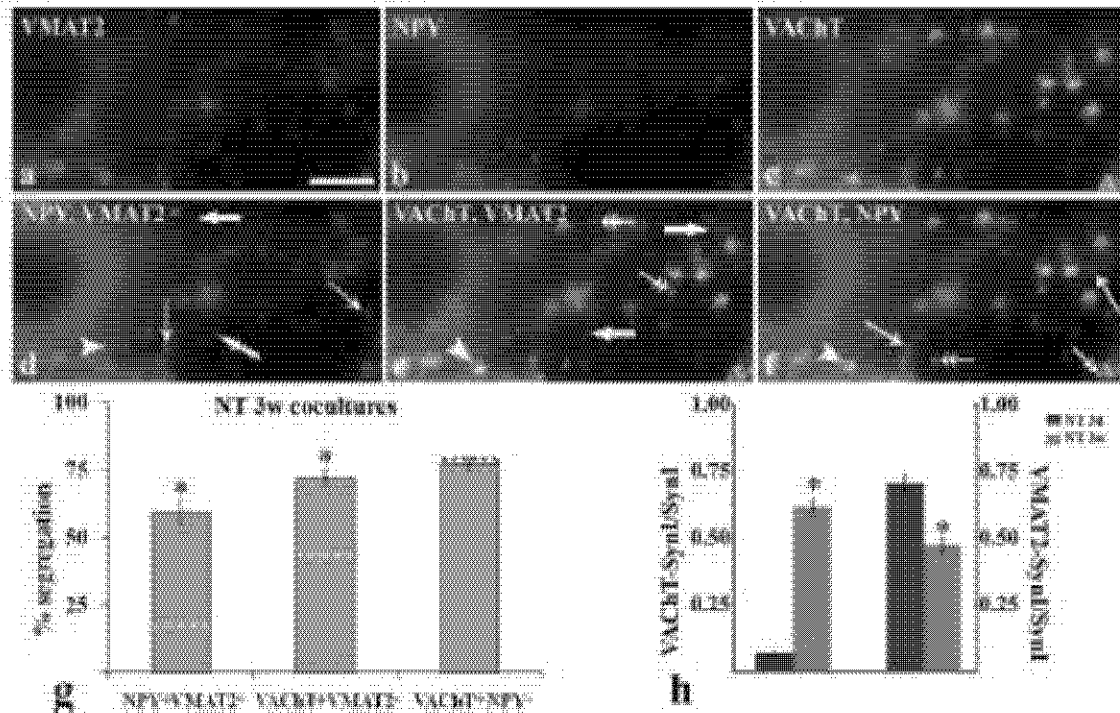


Figure 4. Prolonged growth in culture (three weeks) further enhanced segregation of VMAT2 from NPY and VACHT. Additionally, there was a culture-period dependent increase in VACHT and reduction in VMAT2 expression. Micrographs of immunostaining for VMAT2 (a), NPY (b), and VACHT (c) in neuron–myocyte cocultures without CNTF application fixed after three weeks. The respective merged images VMAT2, NPY (d), VMAT2, VACHT (e) and NPY, VACHT (f) show colocalization (arrow heads), VMAT2 (arrows), NPY (small arrows), and VACHT (double arrows) labels. The graph (g) shows the percent of segregation in comparison with NT 3d values, horizontal marks. The data show that a prolonged period of culture increases segregation of VMAT2 from NPY and VACHT and did not affect segregation of NPY from VACHT. As in the other conditions tested, prolonged periods of culture did not affect colocalization of all markers in cell bodies. Similar to the CNTF condition, prolonged culture periods increased VACHT expression from $6.6\% \pm 0.5\%$ in NT 3d to $61.6\% \pm 2.5\%$ in NT 3w, and reduced VMAT2 expression from $70.5\% \pm 3.0\%$ in NT 3d to $47.3\% \pm 2.6\%$ in NT 3w (h). Calibration: 10 μm .

VACHT in VACHT-containing varicosities ($79.2\% \pm 5.6\%$ in NT 3d compared with $77.1\% \pm 2.5\%$; Fig. 4f,g). Similar to the CNTF treatment, the three-week culture time resulted in an increase of VACHT expression [VACHT was detected in $61.6\% \pm 2.5\%$ of the Syn1-containing varicosities; Fig. 4(c,h)]. The switch from the adrenergic to cholinergic phenotype between three days and three weeks was seen not only in the remarkable increase in VACHT expression, but also in a reduction in VMAT2, which was reduced from $70.5\% \pm 3.0\%$ of Syn1 positive varicosities expressing VMAT2 in NT 3d to $47.3\% \pm 2.6\%$ in NT 3w ($p < 0.01$; Fig. 4g,h), a 33% reduction.

We asked whether trophic effects or neuronal loss could contribute to the effects of CNTF or long culture periods on neurotransmitter segregation by

counting neuron numbers in all conditions. We found no difference in neuron number in any condition (NT 3d, 14.1 ± 3.9 ; CNTF 3d, 13.1 ± 2.0 ; three weeks, 13.9 ± 4.3 neurons/ mm^2). Further, neurons appeared healthy in all conditions (Fig. 5 for a representative phase image), suggesting that changes in health and viability of the neurons following long culture periods or CNTF treatment did not contribute to our findings.

Cocultured Sympathetic Neurons Project Two Types of Varicosities With Different Levels of Neurotransmitter Segregation

We detected two populations of varicosities at different locations in three-day cultures that differed in size

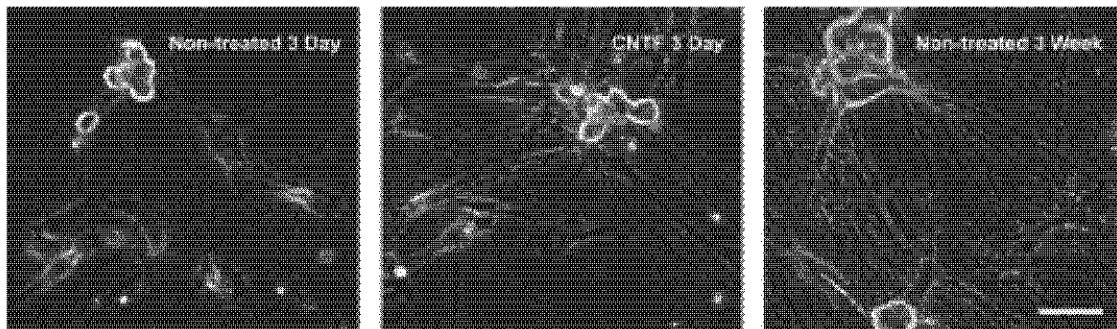


Figure 5 Phase images of cocultured sympathetic neurons and cardiac myocytes. Representative phase images show that cells were healthy and grew robust neuritic projections under each experimental condition. Control neurons appeared morphologically similar at three days (left panel) and after a three-day treatment with CNTF (middle panel). After three weeks the neurons seemed equally healthy with larger somas and neuritic arbor (right panel). Calibration: 30 μm .

and transmitter content; (i) neuritic or distal varicosities were defined as being 25 μm or farther from any neuronal somata in the culture, located in areas occupied by neurites and possibly proximal to myocytes, and (ii) perisomatic or proximal varicosities, which appeared to make contact with neuronal somata. Neuritic varicosities showed less segregation of some mediators and were characterized by small size ($1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$), whereas perisomatic varicosities were of significantly larger size ($2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}^2$; $p = 0.03$) and showed greater neurotransmitter segregation (Fig. 6; of the 1212 analyzed varicosities 652 were perisomatic and 560 neuritic). We found more segregation of VMAT2 from NPY in NPY-containing perisomatic varicosities ($1.7\% \pm 4.9\%$ neuritic vs. $30.9\% \pm 5.9\%$ perisomatic; $p < 0.01$), as well as VMAT2 from VAcHT ($29.0\% \pm 6.8\%$ neuritic vs. $56.4\% \pm 5.2\%$ perisomatic; Fig. 6(d); $p = 0.03$). Thus, varicosities close to neuronal somata showed less colocalization of VAcHT and VMAT2, and NPY and VMAT2, than those located in more distal processes.

Functional Correlates Between Varicosity Properties and Cholinergic Transmission

The segregation of VMAT2 from VAcHT-containing puncta close to neuronal cell bodies (see above) and the increase of VAcHT and decrease of VMAT2 expression in three-week old cultures suggest that synaptic transmission at neuronal synapses could be biased toward cholinergic transmission in older cultures. We therefore examined the transmitter properties of neuronal synapses in the cultures by using whole cell patch clamp recordings to measure spontaneous activity. Consistent with our results showing a

culture-period dependent increase in VAcHT expression, we found that neurons in 2–3 week myocyte cocultures showed spontaneous cholinergic network activity. We found that this spontaneous activity was blocked by hexamethonium (100 μM ; $n = 3$), confirming cholinergic transmission between neurons (Fig. 7(a,b)). Interestingly, the three day cultures ($n = 4$) show little, if any cholinergic transmission between neurons (Fig. 7(b)), despite the fact that we have previously shown that these cultures are capable of synapse formation onto myocytes (Lockhart et al., 1997). This developmental increase in cholinergic transmission during the three-week culture period provides a functional correlate to the dramatic increase in VAcHT-containing varicosities during this same period.

We would expect that any ongoing noradrenergic activity would not so inhibit cholinergic transmission through inhibition of transmitter release by activation of α_2 -autoreceptors (Shepherd and Vanhoutte, 1985; Kahan, 1987); however treatment of the cultures with the α_2 inhibitor, yohimbine (1–10 μM ; $n = 8$) had no effect on the level of cholinergic activity in 11–13 day cultures, a time at which we predict expression of both VMAT2 and VAcHT (Fig. 8(a,d)). We confirmed that noradrenergic signaling was inhibitory for spontaneous cholinergic activity by showing that exogenously applied NE (10–200 μM ; $n = 3$) effectively inhibited spontaneous cholinergic activity (Fig. 8(b,d)) and that this effect was blocked by concurrent application of yohimbine (Fig. 8(c,d)) ($n = 4$). This demonstrates that spontaneous activity in older cultures is mediated by cholinergic, but not noradrenergic signaling at a time at which evoked transmission at myocyte targets is entirely noradrenergic (Slovinitsky et al., 2005). Together with the increase in

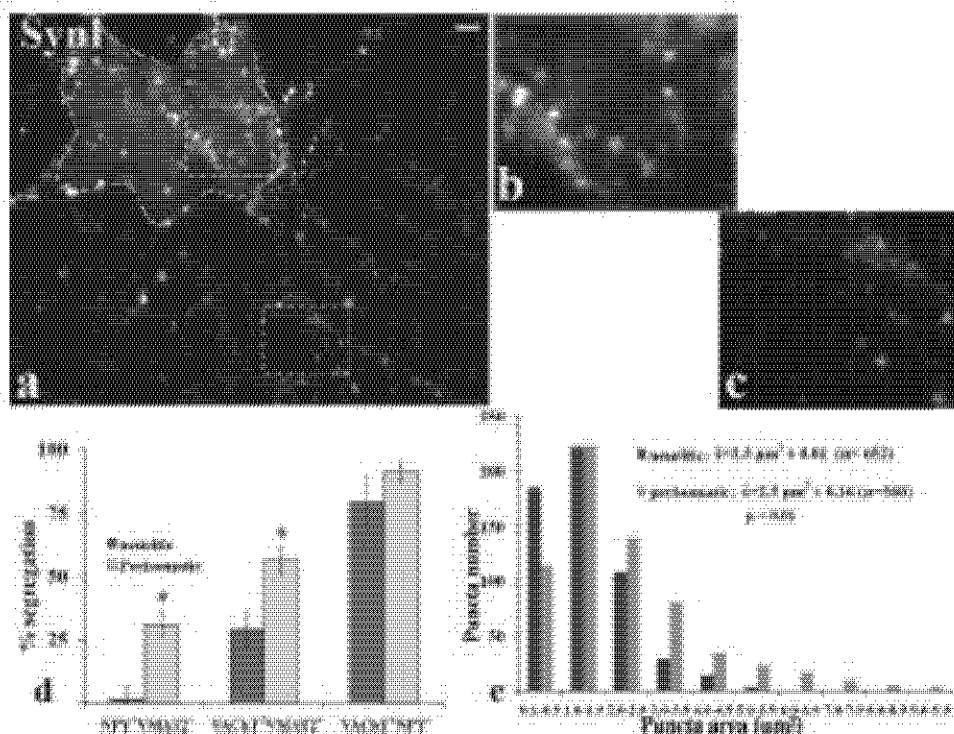


Figure 6. Sympathetic ganglionic neurons project two types of varicosities. Micrographs of cultured neurons labeled Syn1 (a) showing clusters of cell bodies (outlined) and two types of varicosities (b and c; graph e): large ($2.5 \pm 0.2 \mu\text{m}^2$ area) close to neuronal cell bodies (b), and small ($1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$) located 25 μm or more from neuronal somata (c). Varicosities close to cell bodies showed more segregation of VMAT2 from NPY and VACHT (d). Histogram and means showed significant differences in varicosity size, $p < 0.01$ (e). Calibration bar: 30 μm for (a) and 2.5 μm for U of (b and c).

cholinergic transmission associated with increased numbers of VACHT-containing varicosities, these data suggest that our finding of more varicosities containing VACHT without VMAT2 near the cell bodies could play a role in setting the electrophysiological properties of this system.

DISCUSSION

This study provides data for two major conclusions: (i) the two classical sympathetic transmitters ACh and NE and the cotransmitter NPY are partially segregated in sympathetic neurons cocultured with target cardiac myocytes and (ii) the segregation of these transmitters in sympathetic rat neonatal ganglionic neurons is a plastic property. Segregation and transmitter expression can be regulated by external factors such as the neurotrophic factor CNTF, or conditions such as prolonged periods in culture. Sympathetic neurons in our cultures are capable of synthesizing

and releasing both NE and ACh (Lockhart et al., 1997; Yang et al., 2002). Using vesicular transport proteins as an indicator of functional transmitter expression, we found that neurons grown for three days showed significant segregation of VMAT2 and NPY from VACHT with less segregation seen of VMAT2 from NPY. Culturing for three days in the presence of CNTF increased the segregation of VMAT2 from NPY and decreased segregation of NPY from VACHT. A longer culture period of three weeks increased the segregation of both VMAT2 from VACHT and from NPY.

Similar segregation of two classical transmitters has been reported in the central nervous system: dopamine and glutamate in mesencephalic neurons (Sulzer et al., 1998; Sulzer and Rayport, 2000; Dal Bo et al., 2008; Decourties et al., 2005) and ACh and glutamate in spinal motoneurons (Nishimura et al., 2005). In sympathetic ganglia, suggestions of possible segregation of classical transmitters came from the study of microcultures of sympathetic ganglionic

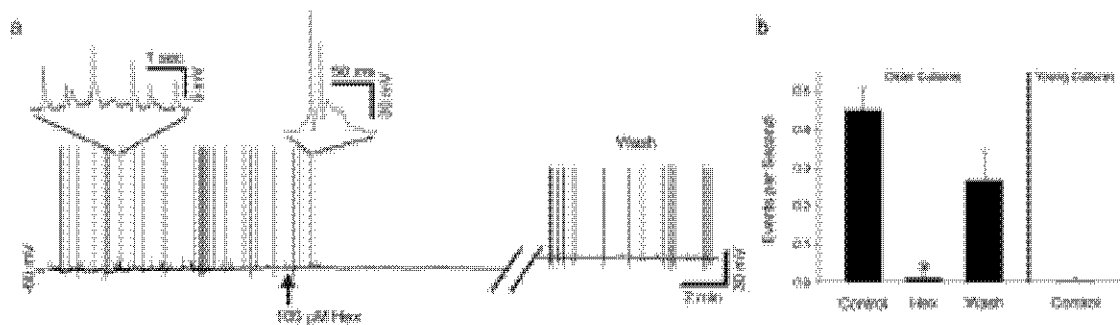


Figure 7 Prolonged culture periods induce spontaneous network activity in neuron–myocyte cocultures driven by cholinergic synaptic transmission. (a) A current-clamp recording from a neuron in a 23-day-old coculture showing ongoing action potential bursts (inset, right) and excitatory postsynaptic potentials (inset, left), which are reversibly blocked by the nicotinic cholinergic antagonist, hexamethonium (100 μM). The time gap was 15 min. (b) A bar plot of events per second showing that 100 μM hexamethonium reversibly decreased spontaneous activity in the culture; $p = 0.002$, paired- t test; $n = 3$. Additionally, cocultures examined at three days (young cultures) exhibited almost no spontaneous activity; $n = 4$.

neurons with myocytes by Landis (1976). In this preparation dual function cholinergic/adrenergic neurons were examined by electron microscopy using permanganate as a marker of adrenergic synaptic vesicles. About two-thirds of the neuronal terminals seen contained granular (permanganate positive) vesicles, whereas the other third had mostly clear vesicles (putatively cholinergic) and only one or few granular vesicles. Although these images reflect only a small region of the neuronal terminals, the study raised the possibility that dual-function neurons possess two classes of terminals.

In addition to evidence for segregation of two classical transmitters, other reports have demonstrated *in vivo* segregation of classical transmitters and peptides in sympathetic preganglionic neurons (Lindh et al., 1986; Morales et al., 1995, 2004; Jiménez et al., 2002; Sámamo et al., 2006, 2007, 2009). Segregation of classical transmitters and peptides has also been reported in sympathetic ganglionic neurons, although the possible contribution of NPY-positive parasympathetic varicosities in the system is not clear (Heym et al., 1994). We have also detected NPY-containing varicosities that were negative for TH and VMAT2 in the iris of the rat (unpublished observation), and confirmed their sympathetic identity by showing that lesion of sympathetic postganglionic nerves removed all NPY and TH or VMAT2-containing varicosities. Together, this work shows the existence of mechanisms for segregating multiple types of neurotransmitters in both central and peripheral systems.

We found several differences in transmitter expression in our cultured neurons compared with findings for sympathetic neurons *in vivo*. *In vivo* it

has been shown that NPY is expressed in only 60% of the ganglionic neurons in the superior cervical ganglia of rats (Romeo et al., 1994). We found that all neurons in our cultures expressed NPY at the level of the soma. Studies by Hall and MacPhedran showed that when cultured with non-neuronal ganglionic cells or with media conditioned by non-neuronal cells, cultured sympathetic neurons expressed NPY heterogeneously in about 60% of cells similar to *in vivo* expression (Hall and MacPhedran, 1995; MacPhedran and Hall, 2001). We remove non-neuronal ganglionic cells from our preparation during the culture procedure, which may account for the upregulation of NPY expression in our neurons. This is consistent with the results of Hall and MacPhedran that showed that sympathetic neurons cultured in the absence of non-neuronal ganglionic cells all expressed NPY (MacPhedran and Hall, 2001). Also in contrast to the observed segregation of TH or VMAT2 and NPY detected in adult ganglionic neurons *in vivo*, neonatal ganglionic neurons cocultured with myocytes generally colocalized the markers for NE and NPY in the same presynaptic hostoma. In our culture conditions, it is likely that most of the NPY-containing varicosities coexpress VMAT2, possibly as a result of NGF-mediated induction of VMAT2. This would be consistent with the documented role of NGF in promoting the adrenergic phenotype (Chan and Patterson, 1977; Lockhart et al., 1997). Although NPY and VMAT2 were often coexpressed, a large proportion of VACHT-containing varicosities did not contain VMAT2 or NPY in cultures grown for three days in the absence of CNTF.

An important question to be addressed is whether the segregation of neurotransmitters is achieved

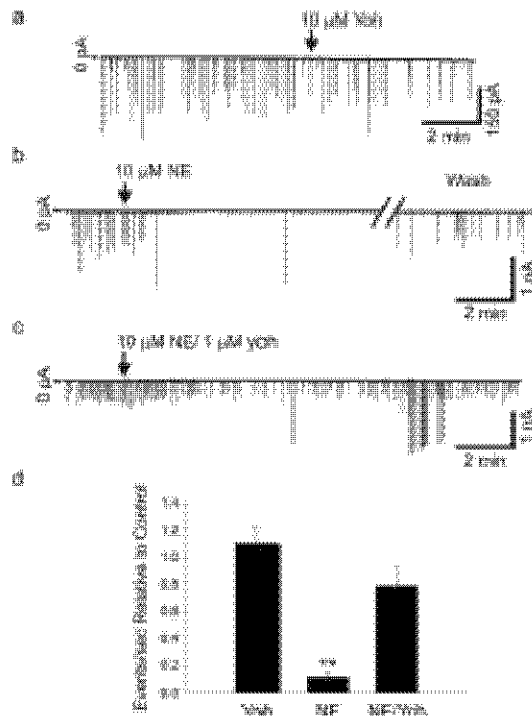


Figure 8. Spontaneous neurotransmission between cultured neurons is predominantly cholinergic and has little or no nondominant contribution. (a) Application of the $\alpha 2$ nonadrenergic antagonist yohimbine (yoh) did not influence ongoing cholinergic transmission. A voltage-clamp recording of spontaneous excitatory synaptic currents made at a -60 mV holding potential from a neuron in coculture for 11 days. (b) Cultured neurons retain sensitivity to inhibition by norepinephrine (NE), as shown by a voltage-clamp recording made at -90 mV, demonstrating that application of $10 \mu\text{M}$ NE almost completely blocked cholinergic synaptic activity in a reversible manner. The time gap was 10 min. (c) NE inhibits cholinergic activity through an $\alpha 2$ nonadrenergic auto-receptor mediated mechanism, as suggested by the finding that coapplication of the $\alpha 2$ antagonist yoh occluded the NE-mediated inhibition of synaptic activity shown in a voltage-clamp recording made at -90 mV. The neurons in b and c were cocultured with myocytes for 15 days before recording. (d) A bar plot of events per second showing that yoh had no influence over baseline activity ($n = 8$), yet NE significantly inhibited cholinergic transmission ($n = 8$; $p = 0.003$, paired t test). Coapplication of yoh with NE blocked the inhibition, suggesting that exogenous NE inhibited activity through an $\alpha 2$ -mediated mechanism.

through segregation of functionally distinct pools of synaptic vesicles. It has been reported that vesicular transport proteins, which move specific transmitter molecules across the vesicular membrane, are heterogeneously located in different types of vesicles. For

example, it has been shown that VMAT2 is expressed in large dense core vesicles whereas VACHT is targeted to small synaptic vesicles in the rat pheochromocytoma PC12 neuronal cells (Weihe et al., 1996; Liu and Edwards, 1997). NPY has also been detected in large dense core vesicles (Pickel et al., 1989). Therefore, it could be possible that segregation is carried out at the level of synaptic vesicles. In light of the new discovery of mRNA translation in axons (Andreasen et al., 2010), it is also possible that mRNA for vesicular proteins could be targeted to axonal compartments or even to individual boutons, raising the possibility that local, varicosity-associated synthesis of the vesicular transporters could play an alternative role to vesicular sorting in transmitter segregation.

Environmental factors not only regulate the expression of particular neurotransmitters, but also the localization of neurotransmitter markers within cell compartments in multitransmitter neurons. Expression of cholinergic markers and ChAT activity in sympathetic neurons is induced by target-derived soluble signaling factors *in vivo* (Rao and Landis, 1990) and when ganglionic neurons are cultured for prolonged periods in the presence of myocytes (O'Lague et al., 1978). However, signaling factors may also control the intracellular location of specific transmitter containing vesicles. For example, CNTF, nerve growth factor, and brain-derived neurotrophic factor influence the intracellular location of VMAT2 and VACHT in the varicosities, axons, and somas of ganglionic neurons cocultured with myocytes (Felder and Dechant, 2007). Using expression of fluorescently-tagged VMAT2 and VACHT, these authors showed that neurotrophic factors increased the separation of the two tagged synaptic vesicular transporters, both in cell somas and neurites. We did not detect an obvious separation of VACHT and VMAT2 label in the cell somas, probably because of lower resolution of our immunolabeling technique. Examining presynaptic boutons that, consistent with previous reports (Landis, 1976; Johnson et al., 1980; Furchspan et al., 1986), harbored both adrenergic and cholinergic vesicles, they established that neurotrophic factors potentiated changes in intrabouton location of the vesicular transporters. Our data suggests that, in addition to transporter sorting within boutons, segregation to separate varicosities can also take place. Our work shows that CNTF treatment induced the segregation of VMAT2 from NPY-containing varicosities, increased the colocalization of NPY and VACHT, and increased the number of VACHT-containing boutons. In addition to the well-documented effect of CNTF in increasing cholinergic marker expression (Finn and Patterson, 1994; Lewis et al., 1994; Mizawa et al.,

1995; Skonimsky et al., 2003), our data demonstrate a further effect of CNTF in promoting segregation of VMAT2 and NPY to separate varicosities of cultured sympathetic ganglionic neurons and reducing segregation of NPY from VACHT.

It is possible that the heterogeneity of transmitter expression at different boutons occurs as a consequence of the development of a cholinergic phenotype in response to cholinergic differentiation factors such as CNTF (Lewis et al., 1994) or leukemia inhibitory factor (generated by myocytes) (Yamamoto et al., 1989). It is possible that segregation occurs during a transitory period between a noradrenergic phenotype and a cholinergic phenotype as VMAT2-containing vesicles begin to disappear from boutons and VACHT begins to predominate. Although it seems clear that neurons progress over time in culture to a more cholinergic population, they do in fact demonstrate segregation of transmitter from early times as we have shown with three-day old cultures. This suggests that transmitter segregation is a general property of the neurons and not completely a consequence of the process of switching transmitter phenotypes. Further studies will be required to test this possibility.

Although the mechanisms by which neurotrophic factors induce changes in VMAT2 and VACHT localization are not clear, Felder and Dechant speculated that neurotrophin-dependent regulation of phosphorylation of the vesicular transport proteins may be involved in the transmitter sorting. Indeed, in PC12 cells sorting of VACHT to specific vesicle pools is disrupted by mutation of a particular serine residue, which is a target of phosphorylation by protein kinase C (Krantz et al., 2000). In our preparation, it is possible that CNTF works through a similar mechanism of phosphorylation to alter the sorting of VMAT2 to varicosities such that some NPY-containing varicosities lack VMAT2 delivery.

The segregation of VMAT2 and NPY was even more pronounced following a three-week culture period. This long growth period also enhanced segregation of VMAT2 and VACHT while having no effect on the segregation of NPY from VACHT. We also confirmed the increase in VACHT expression after three weeks of culture that had been reported by Skonimsky and coworkers (2003) and that is likely to result from exposure of the neurons to myocyte derived cholinergic differentiation factors (Patterson and Chun, 1977). The additional segregation effects induced by prolonged periods of culture suggest that factors made by the myocytes and/or other non-neuronal cells in the cultures also promote neurotransmitter segregation. Alternatively, the neurons themselves could, after three weeks of culture, produce signals

that drive the segregation. Although we can not rule out the possibility that selective neuron loss or changes in myocyte number following application of CNTF or during the long culture period might bias the transmitter expression profile of the cultured cells, the absence of cell loss or trophic support in these conditions suggests that at least overall changes in neuron number do not underlie our findings. Although CNTF may promote the expression of VACHT in formerly adrenergic varicosities, the lack of a change in the segregation of NPY and VACHT in three week cultures could indicate that varicosities that express VACHT without NPY are generated during this culture period.

We found that sympathetic ganglionic neurons cocultured with myocytes generated two populations of varicosities of different sizes and chemical content depending upon their proximity to neuronal cell bodies. A similar result of different sizes of Syn1-containing varicosities was also reported in cocultures of neurons and cardiac myocytes (Shcherbakova et al., 2007). The authors found up to three sizes of varicosities, with the smaller making more contacts over fibroblasts. In our cultures, the population of small varicosities was detected mainly in neurites distant from neuronal cell bodies and these varicosities showed less segregation of VMAT2 from VACHT or NPY. One possibility is that these smaller varicosities are associated with underlying myocytes, and further experiments will be required to analyze the effects of cardiac target contact on bouton size and vesicle content. Larger diameter varicosities were found associated with neuronal cell bodies. These varicosities showed higher levels of segregation of VMAT2 from VACHT or NPY, i.e. there were more VACHT or NPY-containing varicosities lacking VMAT2, raising the possibility of target-dependent regulation of varicosity size and transmitter content.

We speculate that different degrees of segregation of VMAT2 from NPY or VACHT in varicosities at different neuronal sites could be because of different factors such as NGF and BDNF produced by the myocyte and neuronal targets. Such a mechanism would be interesting in light of the effects of these target-specific neurotrophic factors on the functional release properties of sympathetic neurons (Loechhart et al., 1997; Yang et al., 2002). Neuron-neuron synapses within sympathetic ganglia are structurally different from sympathetic connections to cardiac myocytes (Landis, 1976; Ostberg, et al, 1976). Together with our results showing a lack of noradrenergic transmission onto the neurons at a time at which we have recorded noradrenergic transmission onto myocytes (Skonimsky et al., 2003), this work supports the

idea of target-specific local regulation of synaptic transmission as well as synaptic structure. Thus, contact with neuron-produced factors could promote segregation and preferential release of a subpool of cholinergic vesicles, while contact with different cells (myocytes, fibroblast or microglia) could result in the coexistence and release of more than one transmitter required for proper innervation of the target organ.

Our findings of different levels of segregation of VMAT2 from VACHT between varicosities contacting neuronal soma and more distal varicosities are consistent with and could account for earlier functional findings showing that cultured sympathetic neurons form cholinergic synapses onto other neurons (O'Laughe et al., 1974) and maintain noradrenergic connections onto cardiac myocytes (Yang et al., 2002). Thus, varicosities contacting myocytes could be more likely to contain NE and ACh, resulting in predominantly adrenergic transmission onto myocytes. Conversely, about half of the cholinergic varicosities contacting other neurons do not contain NE, which could favor selective release of ACh onto other neurons. The preferential release of ACh at neuronal synapses is supported by our electrophysiology results showing the prevalent cholinergic nature of neuron-neuron synapses. These data represent an interesting example of possible functional consequences of transmitter segregation. The implications for regulation of neuronal and cardiac connections *in vivo* are not clear, since intraganglionic connections make up only a small percentage of cholinergic synapses within the sympathetic ganglia (Osterberg et al., 1976). However, the idea that segregation is a plastic property of the neurons and could play a role in target-specific transmission is intriguing in light of recent work demonstrating an upregulation of sympathetic cholinergic properties during chronic heart failure in rodents and humans (Kamazawa et al., 2010).

Segregation *in vivo* could also play an important role in the differential regulation of release of multiple transmitters at a single target. As mentioned above, we have demonstrated *in vivo* segregation of multiple neurotransmitters in the sympathetic system (Sámano et al., 2009). Although the functional role of this segregation has not been defined, it provides a potential mechanism for independent regulation of the multiple cotransmitters and modulators that are expressed by sympathetic neurons. Indeed, both adenosine triphosphate and NPY, in addition to NE, are released from sympathetic neurons innervating vascular smooth muscle in rodents and humans (Domoso et al., 1997; Rucchi et al., 1999; Bradley et al., 2003). Furthermore, when sympathetic nerves are electrically stimulated, release of these three cotransmitters

are differentially sensitive to stimulation frequency and duration (Domoso et al., 1997; Bradley et al., 2003). Therefore it is possible that *in vivo*, segregation of transmitters and modulators to separate boutons allows independent regulation of release properties while allowing for different metabolic and signaling demands needed to maintain vesicle pools with distinct turnover rates.

The major part of this work was made during a sabbatical stay of MAM in the laboratory of SJB, with a support by PASPA, DGAPA, UNAM. We thank F. Cisneros for his comments and suggestions and J. Hinzeneder and M. Donald for assistance with imaging. AV was in receipt of scholarship from CONACYT-MEXICO.

REFERENCES

- Andresoni C, Zimmerman C, Miller R, Fusco S, Devita S, Saitoh A, Rizo A. 2010. An NGF-responsive element targets mono-inositol monophosphate-1 mRNA to sympathetic neurons. *Nat Neurosci* 13:298–301.
- Bitz DM, Nishiumi MP. 1999. Distinct functions for cotransmitters mediating motor pattern selection. *J Neurosci* 19:6774–6783.
- Bradley E, Law A, He S D, Johnson CD. 2003. Effects of varying impulse number on cotransmitter contributions to sympathetic vasoconstriction in rat tail artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H2007–H2014.
- Buzsáki G. 2004. Co-transmission. *Curr Opin Pharmacol* 4:47–52.
- Chan LL, Patterson PH. 1977. Role of nerve growth factor in the development of rat sympathetic neurons *in vitro*. I. Survival, growth, and differentiation of catecholamine production. *J Cell Biol* 75:694–704.
- Dai Bo G, Bértolo-Carrón N, Méndez JA, Leo D, Rind M, Descarries L, Lévesque D, et al. 2008. Enhanced glutamatergic phenotype of mesencephalic dopamine neurons after neonatal 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience* 156:59–70.
- Descarries L, Bértolo-Carrón N, Rind M, Bo GD, Méndez JA, Trudeau LE. 2008. Glutamate in dopamine neurons: Synaptic versus diffuse transmission. *Brain Res Rev* 58:290–302.
- Domoso MV, Brown N, Camarero C, Costes V, Fournier A, Huáldova-Tora JP. 1997. Stimulation of the sympathetic postmesenteric arterial nerves releases neuropeptide Y potentiating the vasoconstrictor activity of noradrenaline: Involvement of neuropeptide Y-Y1 receptors. *J Neurochem* 69:1048–1059.
- Efendi LG, Lindh B, Håkkinen Y. 1993. The chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia. *Annu Rev Neurosci* 16:471–507.
- Ernsberger U, Rodenas H. 1999. Development of the cholinergic neurotransmitter phenotype in postganglionic sympathetic neurons. *Cell Tissue Res* 297:339–351.

- Plass MJ, Patterson PH. 1994. Neurotrophic cytokines and activin A differentially regulate the phenotype of cultured sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:43-47.
- Feldner E, Dechant G. 2007. Neurotrophic factors acutely alter the sorting of the vesicular acetylcholine transporter and the vesicular monoamine transporter 2 in bimodal sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci* 34:1-9.
- Franco MF, Landis SC. 1999. Cellular and molecular determinants of sympathetic neuron development. *Annu Rev Neurosci* 22:541-566.
- Furshpan EJ, Landis SC, Matsumoto SG, Potter DD. 1986. Synaptic functions in rat sympathetic neurons in microcultures. I. Secretion of norepinephrine and acetylcholine. *J Neurosci* 6:1061-1079.
- Gibbins I. 1995. Chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia. In McLachlan M, editor. *Autonomic Ganglia*. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers, pp 73-122.
- Gukhry G, Landis SC. 1998. Target-dependent development of the vesicular acetylcholine transporter in rodent sweat gland innervation. *Dev Biol* 199:175-184.
- Hall AK, MacPhedran SE. 1995. Multiple mechanisms regulate sympathetic neuronal phenotype. *Development* 121:2361-2371.
- Headley DB, Sahian NM, Horn JP. 2007. Different subcellular distributions of the vesicular monoamine transporter, VMAT2, in subclasses of sympathetic neurons. *Brain Res* 1129:156-160.
- Heyn C, Webber E, Adler D. 1994. Immunocytochemical correlation of peptides and tyrosine hydroxylase in nerve fibres of the human parotid gland. *Arch Oral Biol* 39:213-221.
- Händler B, Mora-Villaverde E, Zetler ME, Morales MA. 2002. Occurrence, co-occurrence and topographic distribution of choline acetyltransferase, met-enkephalin and neurexin in the stellate ganglion of the rat. *Synapse* 43:163-174.
- Johnson ML, Ross CD, Meyers M, Spitznagel EL, Bunge RB. 1986. Morphological and biochemical studies on the development of cholinergic properties in cultured sympathetic neurons. I. Conclusive changes in choline acetyltransferase and synaptic vesicle cytochemistry. *J Cell Biol* 94:690-691.
- Kahan Y. 1987. Prejunctional adrenergic receptors and sympathetic neurotransmission: Studies in canine skeletal muscle vasculature in situ. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 560:1-38.
- Kanawa H, Ieda M, Kimura K, Arai T, Kawaguchi-Manabe H, Matsushita T, Bodo J, et al. 2010. Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-signaling cytokines in rodents. *J Clin Invest* 120:408-421.
- Kwatz DE, Waites C, Gosschet V, Liu Y, Wilson RL, Tan PK, Klumperman J, et al. 2009. A phosphorylation site regulates sorting of the vesicular acetylcholine transporter to dense core vesicles. *J Cell Biol* 149:379-396.
- Landis SC. 1976. Rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures: Correlation of the fine structure of endings with neurotransmitter function in single neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:4220-4224.
- Landry M, Vila-Pocillo E, Hechtel T, Calas A. 2005. Differential sorting of coexisting neuropeptides in vasopressin neurons. *Eur J Neurosci* 17:579-589.
- Lewis SE, Rao MS, Symes AJ, Damer WT, Fink JS, Landis SC, Hyman SE. 1994. Coordinate regulation of choline acetyltransferase, tyrosine hydroxylase, and neuropeptide mRNAs by ciliary neurotrophic factor and leukemia-inhibitory factor in cultured sympathetic neurons. *J Neurochem* 63:429-438.
- Lindh B, Staines W, Hvalby T, Terenius L, Salvansara P. 1988. Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibres in guinea pig autonomic ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3316-3320.
- Liu Y, Edwards RH. 1997. Differential localization of vesicular acetylcholine and monoamine transporters in PC12 cells but not CHO cells. *J Cell Biol* 139:907-916.
- Liu Y, Peter D, Merckel A, Kwatz D, Plass JP, Edwards RH. 1996. A molecular analysis of vesicular amine transport. *Behav Brain Res* 73:51-58.
- Loebner ST, Mead JN, Plesko JM, Simonsky JD, Birnba SE. 2000. Nerve growth factor collaborates with myocyte-derived factors to promote development of presynaptic sites in cultured sympathetic neurons. *J Neurobiol* 42:460-476.
- Loebner ST, Turigiano GG, Birnba SE. 1997. Nerve growth factor modulates synaptic transmission between sympathetic neurons and cardiac myocytes. *J Neurosci* 17:9573-9582.
- Luther JA, Birnba SE. 2006. Nerve growth factor decreases potassium currents and alters repetitive firing in rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 96:946-958.
- MacPhedran SE, Hall AK. 2001. Influence of non-neuronal cells on establishment of neuropeptide Y expression by sympathetic neurons in vitro. *Dev Neurosci* 23:307-317.
- Medighi A. 2002. Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 66:161-190.
- Miyawa H, Takahashi B, Deguchi T. 1995. Coordinate expression of vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in sympathetic superior cervical neurons. *Neuroreport* 6:965-968.
- Morales MA, Hancock JC, Hoover DR. 2004. Neurochemical heterogeneity in sympathetic ganglia and its implications from cardiovascular regulation. In: Dun NJ, Machado BH, Pilowsky PM, editors. *Neural Mechanisms of Cardiovascular Regulation*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers, pp 303-323.
- Morales MA, Holmberg K, Xu Z, Casanovi C, Hartman B, Eason P, Gokhale M, et al. 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.
- Nishimura H, Restrepo CE, Ryge J, Yasugawa Y, Kiehn O. 2005. Mammalian motor neurons co-release glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5243-5249.

- O'Leary PH, Obama K, Claude P, Parsipan EJ, Potter DD. 1974. Evidence for cholinergic synapses between dissociated rat sympathetic neurons in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:3602-3606.
- O'Leary PH, Parsipan EJ, Potter DD. 1978. Studies on rat sympathetic neurons developing in cell culture. II. Synaptic mechanisms. *Dev Biol* 67:404-423.
- Ozberg AJ, Raisman G, Field PM, Iverson LL, Zigmond RE. 1976. A quantitative comparison of the formation of synapses in the rat superior cervical sympathetic ganglion by its own and by foreign nerve fibres. *Brain Res* 107:443-470.
- Patterson PH, Chan LLY. 1977. The induction of acetylcholine synthesis in primary cultures of dissociated rat sympathetic neurons. I. Effects of conditioned medium. *Dev Biol* 56:263-280.
- Pickel VM, Chan I, Maccari VL. 1989. Neuropeptide Y-like immunoreactivity in neurons of the solitary tract nuclei: Vesicular localization and synaptic input from GABAergic terminals. *Brain Res* 476:265-278.
- Potter DD, Matsumoto SG, Landis SC, Sain DW, Parsipan EJ. 1986. Transmitter status in cultured sympathetic principal neurons: Plasticity, guided expression and diversity. *Prog Brain Res* 68:503-520.
- Racchi H, Umarahai MJ, Howard M, Moran S, Zalagetti K, Hulsbro-Toro JP. 1992. Adenosine 3'-triphosphate and neuropeptide Y are co-transmitters in conjunction with noradrenaline in the human splanchnic vein. *Br J Pharmacol* 115:1175-1185.
- Rao MS, Landis SC. 1990. Characterization of a target-derived neuronal cholinergic differentiation factor. *Neuron* 5:979-910.
- Romes BE, Fink T, Yamashita N, Weihe E. 1994. Distribution and relative proportions of neuropeptide Y- and peptide YY-containing noradrenergic neurons in rat superior cervical ganglion: Separate projections to submaxillary lymph nodes. *Peptides* 15:1479-1487.
- Saadat S, Sondner M, Wolter H. 1999. Cholinergic neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol* 108:1807-1816.
- Sámano CG, Zecina 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. Online.
- Sámano C, Zecina ME, Cifuentes F, Morales MA. 2009. Segregation of met-enkephalin from VAcHT and ChAT in sympathetic preganglionic varicosities mostly lacking synaptophysin and synaptotagmin. *Neuroscience* 163:180-189.
- Sámano C, Zecina ME, Martín 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 rat sympathetic preganglionic neurons. *Synapse* 60:295-306.
- Shcherbakova OGI, Hurr CM, Kiang Y, Dell'Acqua ML, Zhang Q, Tsien RW, Kobilka BK. 2007. Organization of beta-adrenoceptor signaling components by sympathetic innervation of cardiac myocytes. *J Cell Biol* 176:521-533.
- Shepherd JT, Vanhoutte PM. 1985. Local modulation of adrenergic neurotransmission in blood vessels. *J Cardiovasc Pharmacol* 7 (Suppl 3):S169-S178.
- Shoninsky JD, Yang B, Hintonmeyer JM, Nokes EB, Birren SJ. 2002. BDNF and CNTF regulate cholinergic properties of sympathetic neurons through independent mechanisms. *Mol Cell Neurosci* 23:648-660.
- Soskin WS, Swens-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 USA* 87:4845-4848.
- Sulzer D, Joyce MP, Liu L, Gekker D, Haber SN, Hatan Y, Rappaport S. 1998. Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* 18:4388-4002.
- Sulzer D, Rappaport S. 2000. Dale's principle and glutamate co-release from ventral midbrain dopamine neurons. *Amino Acids* 19:45-52.
- Vega A, Birren SJ, Morales MA. 2008. Differential coating of VAcHT and VMAT/NPY to separate projections of rat neonatal sympathetic neurons co-cultures with myocytes. Program No. 37.6. Neuroscience Meeting Planner, Washington, DC: Society for Neuroscience. Online.
- Weihe E, Tian-Cheng JH, Schäfer MK, Erickson JD, Hatan YE. 1996. Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to a specific population of small synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3547-3552.
- Yamamoto T, Fukuda K, Acherachi R, Kurohachi S, Furu MI, Patterson PH. 1989. The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* 246:1412-1416.
- Yang B, Shoninsky JD, Birren SJ. 2002. A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nature Neurosci* 5:339-343.