



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

**COTRANSMISIÓN Y SEGREGACIÓN DE NEUROTRANSMISORES CLÁSICOS (GABA-ACH)
EN NEURONAS SIMPÁTICAS.**

TESIS

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

PRESENTA:

BIOL. DIANA ELINOS CALDERON

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MIGUEL A. MORALES MENDOZA
IIB, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. CLORINDA ARIAS ALVAREZ
IIB, UNAM

DR. STEFAN MIHAILESCU
FAC. MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2016.



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.

***A Tsayam, Hamsini
y Pável.***

Los amo infinitamente.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas UNAM por permitirme realizar mis estudios de posgrado de manera exitosa.

A CONACyT por apoyarme con una beca de Doctorado (346298 / 239714) para mis estudios.

Al Dr Miguel A. Morales Mendoza, tutor principal del trabajo, quien con su experiencia y conocimiento me asesoró y ayudó durante todo el Doctorado. Un gran ser humano e investigador.

Al Dr. Fredy Cifuentes, gracias por tus comentarios y revisiones detalladas al trabajo. También gracias por tu amistad.

A mi comité tutorial, Dra. Clorinda Arias y Dr. Stefan Mihailescu, gracias por los valiosos comentarios y observaciones. Gracias por su apoyo.

DEDICATORIA

- **Dedico de manera especial ésta tesis a mis hijos, Tsayam y Hamsini, y mi esposo Pável. Gracias por todo el apoyo, amor, paciencia, y por formar parte de éste gran logro desde el inicio, por alentarme a seguir y nunca caer y por ser partícipes de cada alegría que me dio el Posgrado. Siempre pendientes y preguntando por la tesis, son mi vida.**
- **A mis padres, Leticia y Javier, por estar en todo momento, tanto para mí como para mi familia. Gracias por la ayuda, el tiempo y por la vida. Los quiero mucho.**
- **A mi “hermanito” Uro, con quien siempre es agradable platicar sobre ciencia y no ciencia. Gracias por los momentos chistosos y por tenerme siempre confianza para platicar algunas de tus inquietudes.**
- **A mis tíos, abuelos y primos, gracias Familia.**
- **A mis amigos del laboratorio y del Instituto, Rommel, Raúl, Anabel, Jessi, Filiberto, Manuel, Pablo, Luis y Natali , gracias por los momentos tan divertidos dentro de Biomédicas. Pláticas, risas, seminarios y discusiones de artículos, por formar parte de una de las mejores etapas académicas de mi vida. Gracias a Luis y Raúl por su ayuda en la parte experimental, fueron fundamentales. Especial agradecimiento a mis hermanos del lab (Rommel y Raúl), siempre recordaré las risas que teníamos de todo. Gracias a Ma. Elena por tu apoyo en el trabajo y tus consejos.**
- **A mis amigas de vida, Carla, Eva, Perla y Claudia, han pasado varios años de que las conocí, pero siempre con comentarios de apoyo tanto académico como personal. Gracias por estar ya saben que las quiero.**

INDICE

| | | |
|------|---|----|
| 1. | ABREVIATURAS..... | 7 |
| 2. | ABSTRACT..... | 8 |
| 3. | RESUMEN..... | 9 |
| 4. | INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| 4.1 | Historia de la Neurotransmisión Química..... | 10 |
| 4.2 | Tipos de Neurotransmisión..... | 12 |
| 4.3 | Cotransmisión..... | 13 |
| 4.4 | Segregación de neurotransmisores..... | 15 |
| 4.5 | Presencia de GABA en las Neuronas Preganglionares Simpáticas (NPS) y distribución topográfica ganglionar de las varicosidades GABAérgica..... | 20 |
| 5. | PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN..... | 22 |
| 6. | HIPÓTESIS..... | 23 |
| 7. | OBJETIVOS..... | 23 |
| 8. | METODOLOGÍA..... | 24 |
| 9. | RESULTADOS..... | 35 |
| 9.1. | Presencia de GAD67 en somas y botones sinápticos de las neuronas preganglionares simpáticas (NPS)..... | 35 |
| 9.2. | Las neuronas ganglionares expresan la subunidad $\alpha 4$ del receptor GABA _A | 39 |
| 9.3. | GAD67 y ChAT coexisten en la médula sin embargo en los botones sinápticos GAD67 se localiza en botones que carecen de VACHT..... | 41 |
| 9.4. | Las varicosidades que son inmunopositivas a GAD67 no contienen al neuropéptido mENK, otro cotransmisor ganglionar inhibitorio..... | 43 |
| 9.5 | Las neuronas Densamente contactadas por GABA (DCG) se localizan de manera preferencial en la region rostral y envían sus proyecciones principalmente por el | |

| | |
|---|----|
| NCI..... | 44 |
| 9.6 Probable papel funcional de la distribución de GAD67 y de la la segregación entre GAD67-VACHT. | 46 |
| 9.7 Correlación funcional de las diferencias regionales de los tipos de R GABA _A | 48 |
| 10. DISCUSIÓN..... | 50 |
| 11. CONCLUSIONES..... | 56 |
| 12. BIBLIOGRAFÍA..... | 58 |
| 13. ANEXO 1. Segregation of Acethylcholine and GABA in the rat superior cervical ganglia: functional correlation..... | 69 |

1. ABREVIATURAS

| ABREVIATURA | SIGNIFICADO |
|-------------------------|---|
| NTs | Neurotransmisores |
| ACh | Acetilcolina |
| NA | Noradrenalina |
| GABA | Acido gamma-aminobutírico |
| Svc | Vesículas pequeñas claras |
| ATP | Adenosín Trifosfato |
| NPY | Neuropéptido Y |
| LDGVs | Vesículas grandes densas |
| CGRP | Péptido relacionado al gen de la calcitonina |
| VIP | Péptido intestinal vasoactivo |
| VACHT | Transportador vesicular de ACh |
| ChAT | Transferasa de acetato y colina |
| VMAT2 | Transportador vesicular de monoaminas 2 |
| NPS | Neuronas preganglionares simpáticas |
| 5HT | 5 Hidroxitriptamina |
| VGLUT3 | Transportador vesicular de glutamato 3 |
| SNP | Sistema Nervioso Periférico |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| GCS | Ganglio Cervical Superior |
| LTP | Potenciación a largo plazo |
| BSA | Suero bovino albúmina |
| GAD67 | Descarboxilasa del ácido glutámico 67 |
| Syn | Sinaptofisina |
| GABA_A | Receptor del tipo GABA_A |
| mENK | metionina-Encefalina |
| DCG | Densamente contactadas por GABA |
| NCI | Nervio carotídeo interno |
| NCE | Nervio carotídeo externo |

2. ABSTRACT

Sympathetic neurons have the capability to segregate their neurotransmitters (NTs) and co-transmitters to separate varicosities of single axons; in culture, ganglionic sympathetic neurons can segregate the two classical transmitters, acetylcholine (ACh) and noradrenaline. Considering that, besides ACh, sympathetic neurons employ other classical NTs such as gamma aminobutyric acid (GABA), herein, we explore whether these neurons segregate ACh and GABA in the superior cervical ganglia of the rat. In addition, we determined the topographical distribution of GABAergic varicosities and the somatic GABA_A receptor, as well as the regional distribution of the segregation of ACh and GABA. Finally, we tried to determine the correlation between the distribution of GABA, segregation, and ganglionic transmission. We found that SPN *in vivo* do segregate ACh and GABA. GABAergic varicosities and GABA_A receptor expression showed a rostro-caudal gradient along ganglia; in contrast, segregation exhibited a caudo-rostral gradient. These uneven distributions correlate with stronger synaptic transmission in the caudal region, which is more resistant to inhibition by exogenous GABA. Finally, we discuss a possible correlation of these different levels of GABA modulation and the function of the target organs innervated by rostral and caudal ganglionic neurons.

3. RESUMEN

Las neuronas simpáticas tienen la capacidad de segregar a sus neurotransmisores (NTs) y cotransmisores a distintas varicosidades de un solo axon; en cultivo las neuronas ganglionares simpáticas pueden segregar a dos neurotransmisores clásicos acetilcolina (ACh) y noradrenalina (NA). Además de ACh, las neuronas preganglionares simpáticas utilizan otros neurotransmisores clásicos como el ácido gamma-aminobutírico (GABA), es por ello que exploraremos si estas neuronas segregar ACh y GABA. Determinamos la distribución topográfica de las varicosidades GABAérgicas y la localización en los somas, así como la presencia de subunidad $\alpha 4$ GABA_A y la distribución regional de la segregación entre ACh y GABA. Presentamos una correlación entre la distribución de GABA, la segregación y la transmisión ganglionar. Encontramos que, *in vivo*, las NPS segregar ACh y GABA; las varicosidades GABAérgicas y la expresión del receptor GABA_A muestran un gradiente rostro-caudal a lo largo del ganglio mientras que la segregación muestra un gradiente caudo-rostral. Tomando en cuenta éstas distribuciones y realizando pruebas electrofisiológicas observamos que las distribuciones del GABA y su receptor correlacionan con menor y mayor excitabilidad en las neuronas rostrales y caudales que envían sus axones por el NCI y por el NCE respectivamente. Además observamos mayor sensibilidad a GABA y al antagonista GABAérgico la picrotoxina en la región rostral. Estos datos sugieren además la presencia de distintos tipos de receptores GABA_A en las neuronas rostrales y caudales, lo que resulta en diferencias regionales en los niveles de la inhibición GABAérgica. Finalmente discutimos la posible correlación entre la segregación de GABA y ACh y el rol del GABA en la transmisión ganglionar y en la regulación simpática de los órganos blanco

4. INTRODUCCIÓN.

4.1 Historia de la neurotransmisión química.

Las neuronas se comunican a través de sitios especializados denominados sinapsis, las cuales pueden ser de tipo eléctrico o químico. En la sinapsis de tipo eléctrico las neuronas se comunican a través de uniones comunicantes (GAP junctions), las cuales son canales protéicos que forman un poro por el que pasan pequeñas moléculas o iones, en algunos casos puede ser bidireccional; en la sinapsis de tipo químico una neurona (presináptica) libera sustancias transmisoras como consecuencia de la llegada de un potencial de acción, éstas moléculas liberadas tendrán un efecto sobre otra neurona (post-sináptica) mismo que dependerá del tipo de receptor en el que actúen (Pitman, 1984). En éste trabajo nos enfocamos en la sinapsis de tipo químico.

El descubrimiento de la neurotransmisión química fue un proceso que tomó aproximadamente 30 años y que se dio en paralelo con el de la sinapsis. Los pioneros en la historia fueron Walter Gaskell y John Langley. Ambos establecieron lo que hoy se conoce como Sistema Nervioso Autónomo; en 1900 Langley hizo dos contribuciones fundamentales, demostró que la adrenalina tenía efectos similares a la estimulación simpática ya que producía efectos en los órganos aún cuando sus nervios habían sido cortados o degenerados y encontró que extractos nicotínicos afectaban a los ganglios simpáticos pero no a los nervios, lo que lo llevo a proponer la existencia de sustancias receptoras neuronales. Posteriormente, fue un estudiante de Langley, Thomas Elliot (1904), quien después de realizar experimentos en músculo liso y algunas glándulas propone que la adrenalina podría ser liberada por los nervios simpáticos.

Por otro lado Henry Dale descubre la Acetilcolina (ACh) y demuestra que simula los efectos de la estimulación parasimpática (1914). Sin embargo, fue hasta 1921, cuando Otto Loewi observa que los latidos de un corazón de rana disminuyen al estimular el nervio vago, y que las sustancias liberadas por

éste, al llevarlas a un segundo corazón ocurría lo mismo pero sin la estimulación eléctrica, demostrando así que los nervios liberan moléculas transmisoras capaces de tener un efecto en los órganos. En 1930 Henry Dale y Gaddum demuestran la existencia de ACh en el organismo y tras experimentos en músculo esquelético, concluyen que la contracción ocurre en respuesta a la liberación de ACh por los nervios espinales. Finalmente, Feldberg y Gaddum (1934) muestran que la liberación de moléculas químicas no solo se da en glándulas sino también entre sinapsis de neuronas (Valenstein, 2002). Con éstos resultados la transmisión sináptica de tipo químico comenzaba a ser más la regla que la excepción.

Estos descubrimientos hicieron que Henry Dale se convirtiera en uno de los principales defensores a favor de la transmisión sináptica de tipo químico, sin embargo, aún existían investigadores como John Eccles, que estaba a favor de la transmisión eléctrica. Fue un debate que duró años hasta que Eccles, después de hacer registros electrofisiológicos en motoneuronas de la médula espinal (Burke, 2006), cambió sus argumentos y aceptó la transmisión química entre neuronas.

Dale tenía la hipótesis de que una neurona podía liberar más de una molécula transmisora, esto gracias a observaciones realizadas en la vasodilatación parasimpática, la cual mostraba resistencia a atropina. Con dichos resultados, Dale argumenta que la resistencia podría deberse a la existencia de otros transmisores con varios niveles de antagonismo para la atropina. Por lo que y en vista de esas observaciones, Dale nunca estableció que las neuronas tenían un solo neurotransmisor, más bien lo que él concluyó en 1935 fue que una neurona pudiera liberar la misma substancia transmisora desde todas sus terminales sinápticas.

Es hasta que Eccles mal interpreta la idea y propone el dicho de Dale como, el *Principio de Dale* diciendo “*de que una neurona puede liberar un solo transmisor*”, y un punto muy importante

que menciona “*la misma maquinaria se distribuye en toda la célula, y una célula no puede sintetizar un tipo de sustancia transmisora para algunas de sus terminales y otro tipo para otras*” (Strata & Harvey, 1999).

Así queda establecida una de las ideas clásicas de la neurobiología, *El Principio de Dale*; sin embargo, posteriormente surgirían evidencias que apoyarían la presencia y liberación de más de una molécula transmisora, con lo cual se revisaría el Principio de Dale y se adecuaría a “una neurona puede sintetizar uno o más moléculas transmisoras”. Con ésta modificación al Principio de Dale surgen conceptos importantes a definir como el de neurotransmisor y cotransmisor.

4.2 Tipos de Neurotransmisión.

Como hemos mencionado con anterioridad, en la sinapsis de tipo químico existe liberación de neurotransmisores, éstas moléculas son los mensajeros químicos entre las neuronas y se engloban en lo que se denomina pequeñas moléculas neurotransmisoras. Dentro de esta categoría se subdividen en las siguientes clases: (1) Acetilcolina; (2) Aminoácidos, aquí encontramos a GABA, Glicina, Glutamato y Aspartato; (3) Purinas, incluye el ATP y (4) Aminas biogénicas, se subdividen en catecolaminas (Dopamina, Norepinefrina, Epinefrina), indolaminas (serotonina) e imidazolamina (Histamina) (Purves, 2004).

Los neurotransmisores (NTs) tienen características muy particulares, mismas que los definen: (1) se almacenan en vesículas pequeñas (svc), (2) se liberan desde sitios sinápticos, (3) son sintetizados por enzimas específicas, (4) después de ser liberados por la neurona presináptica se unen a receptores (ionotrópicos o metabotrópicos), (5) son eliminados en el espacio intersináptico y la principal es que (6) produce una respuesta despolarizante o hiperpolarizante en la neurona postsináptica. Figura 1. (Süudhof, T, 2008).

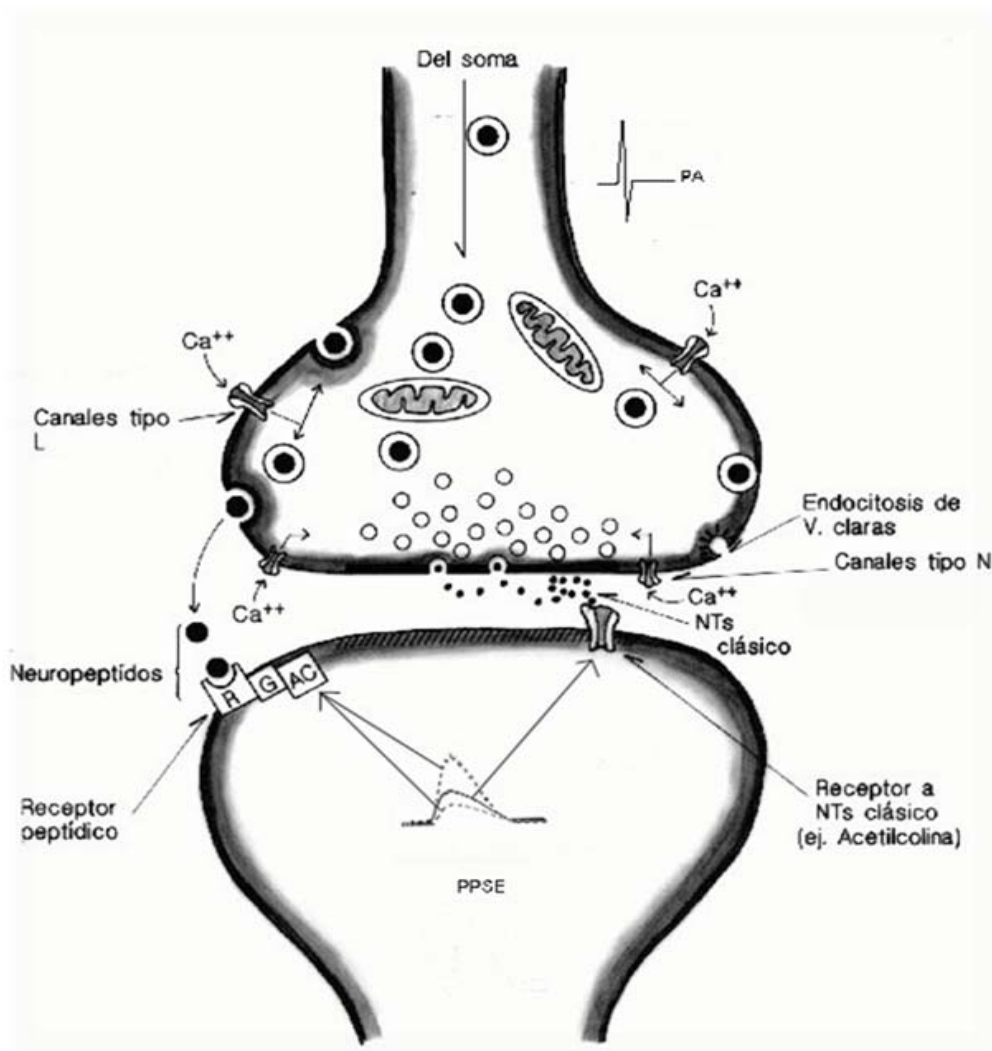


Figura 1. Mecanismos y características de liberación del neurotransmisor clásico y el cotransmisor.

Co-transmisión

Como ya se mencionó, durante varias décadas se pensó que las neuronas sintetizaban y liberaban una sola molécula transmisora, “Principio de Dale” (una neurona, un neurotransmisor), tiempo después es modificada la idea estableciendo “Una neurona puede sintetizar uno o más moléculas transmisoras” con lo que surge el concepto llamado Cotransmisión al cual se puede definir como la presencia y liberación de más de una molécula transmisora en las neuronas. (Burnstock, G 1976; Burnstock et al., 2013).

Las evidencias que ayudan a establecer el concepto de cotransmisión comienzan alrededor de los años 50s, cuando Koelle y colaboradores observan la presencia de acetilcolinesterasa (enzima encargada de la degradación de acetilcolina) en neuronas del hipotálamo, de las cuales mencionan la posibilidad de que la ACh sea la señal de liberación de oxitocina y vasopresina dentro de la misma neurona. En este trabajo se postula por primera vez la presencia de más de un neurotransmisor en una sola neurona (Koelle et al., 1957).

A partir de esta evidencia surgieron diversos trabajos que apoyaron la idea de la presencia de más de una molécula transmisora en las neuronas, tanto en invertebrados como en vertebrados (véase la revisión de Burnstock, 2013). Así, se ha observado la presencia de somatostatina en neuronas noradrenérgicas; de ATP como transmisor en neuronas colinérgicas; presencia de NPY, Sustancia P y encefalinas en el ganglio cervical superior; presencia de GABA y glicina en neuronas de la médula espinal y coexistencia de glutamato y GABA en neuronas del hipocampo, entre otros (Campbell, 1987; Lindh & Hokfelt., 1990; Burnstock, 2004; Gutierrez, 2005; Sámano et al., 2006). La aceptación del concepto de cotransmisión implica el desarrollo de una nueva forma de diferenciar a las moléculas transmisoras, es así como surge el término de cotransmisor. Si bien se han especificado las características de un neurotransmisor clásico ahora es necesario mencionar las características de un cotransmisor: (1) son sintetizados en el cuerpo celular como parte de un precursor (2) se almacena preferencialmente en vesículas grandes de núcleo denso (LDGVs), (3) se puede liberar desde sitios extrasinápticos y la principal (4) por sí solo no cambia el potencial de membrana de la neurona postsináptica, únicamente modula la respuesta generada por el neurotransmisor clásico (Boarder, 1989).

Inicialmente se pensaba que los cotransmisores eran en su mayoría neuropéptidos. Moléculas como el NPY, Sustancia P, VIP, somatostatina y CGRP (Hokfelt, 1991), sin embargo tiempo después se mostró evidencia en la cual un neurotransmisor clásico también podría funcionar de manera moduladora, un ejemplo es la participación de glicina y GABA en la transmisión sináptica en motoneuronas (Jonas et al., 1998). Así, después de recopilar evidencias que apoyen la cotransmisión, esta se convirtió en una característica común en la transmisión sináptica.

Finalmente, al tener a más de una molécula transmisora las posibilidades de modulación tanto presináptica como postsináptica aumentan, haciendo así que el proceso de neurotransmisión sea aún más complejo.

4.4. Segregación de neurotransmisores.

Al aceptar la cotransmisión surgió la pregunta de cómo se distribuyen regionalmente el neurotransmisor clásico y el cotransmisor dentro de las terminales nerviosas. Durante varios años se aceptó lo que se consideró como el Principio de Dale modificado que *las neuronas almacenaban y liberaban la misma combinación de transmisores desde todas sus terminales nerviosas*. Sin embargo, en los 90s Sossin et al., presenta por primera vez evidencia que demuestra que las neuronas son capaces de distribuir de manera heterogénea a sus moléculas transmisoras, a lo que se denominó patrón de segregación (Sossin et al., 1990).

Los trabajos de Sossin y colaboradores se realizan en neuronas de *Aplysia californica* y mostraron que dos neuropéptidos o las enzimas que los sintetizan, están presentes en los cuerpos celulares, pero se encuentran almacenados en distintas vesículas y son enviados a diferentes procesos neuronales, permitiendo así la liberación y función diferencial de estas moléculas transmisoras (Sossin

et al., 1990).

Tiempo después, Blitz y Nusbaum en 1999 estudiaron el sistema nervioso del cangrejo (*Cancer borealis*) y observaron un mecanismo similar, mostraron liberación de GABA y proctolina a diferentes blancos. Con base en éstas evidencias, en ese año Marder propone tres posibilidades para el almacenamiento y liberación de múltiples transmisores, el caso 3 corresponde al patrón de segregación. (Figura 2). Estas evidencias son las primeras que hacen pensar que los diferentes neurotransmisores se podrían almacenar en distintas terminales nerviosas de una sola neurona.

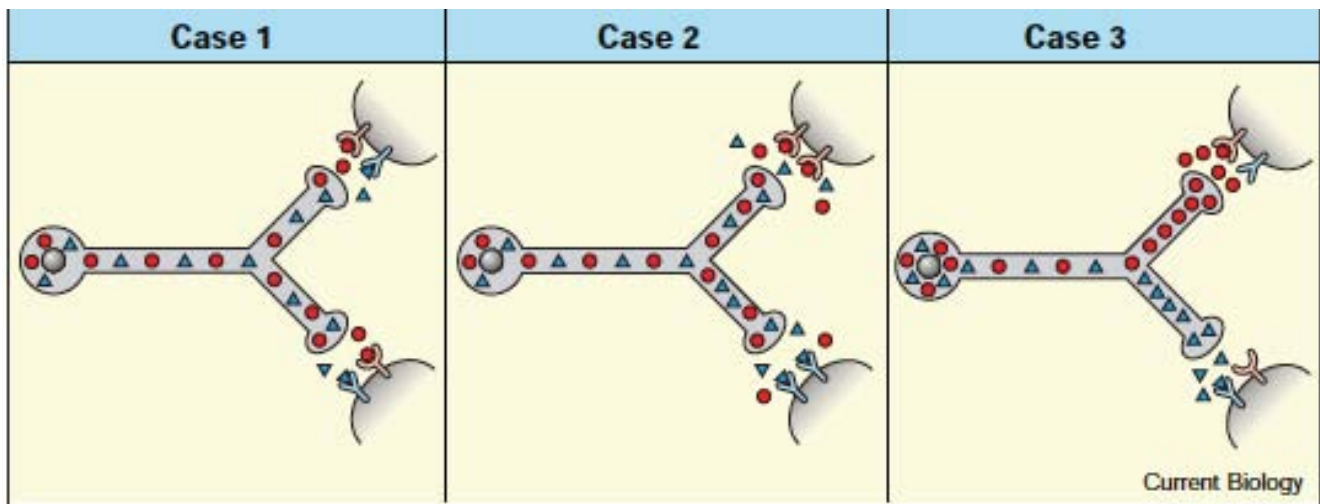


Figura 2. Posibilidades de almacenamiento y liberación de múltiples transmisores. En el caso 1 observamos una neurona con la liberación de dos moléculas desde todas sus terminales nerviosas (círculos rojos y triángulos azules), y en la neurona postsináptica existen dos tipos de receptores (uno para cada molécula); en el caso 2 una neurona libera por igual en todas sus terminales nerviosas dos moléculas, sin embargo la neurona postsináptica únicamente tiene uno u otro receptor; finalmente en el caso 3 la neurona libera de manera separada a sus moléculas transmisoras, a pesar de que en la postsinapsis existan ambos tipos de receptores. Tomada de Marder., 1999.

Cabe mencionar, que las primeras evidencias de segregación se presentaron en invertebrados, aunque paralelamente se describió la segregación en mamíferos. Así, a principios de los 90s Hattori y colaboradores muestran por primera vez evidencia de la segregación en mamíferos. Estos investigadores encontraron que neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra hacen dos tipos de contactos sinápticos con las células estriatales: (1) sinapsis simétricas con TH y dopamina y (2)

sinapsis asimétricas que solo expresan Dopamina pero **no Threvisar lo de th**, lo que interpretaron como segregación de TH y dopamina en estas neuronas (Hattori et al., 1991). Uno de los grupos que han aportado también evidencias de segregación de neurotransmisores clásicos es el grupo de Rayport, quienes demostraron que neuronas dopaminérgicas del area ventral tegmental (AVT) son capaces de segregar y liberar dopamina y glutamato desde diferentes terminales nerviosas (Sulzer et al., 1998; Sulzer & Rayport, 2000).

Posteriormente, una de las evidencias que muestran claramente la segregación se observa en los trabajos realizados por Landry, en el cual neuronas hipotalámicas magnocelulares empaquetan y entregan diferencialmente a gránulos secretores que contienen galanina y vasopresina hacia dendritas y axones, respectivamente (Landry et al., 2003).

Poco tiempo después Nishimaru observa que las motoneuronas que liberan ACh en la unión neuromuscular, y ACh y glutamato en las sinapsis con las interneuronas Renshaw, muestran botones en estas sinapsis que almacena glutamato, pero no ACh, estos hallazgos sugieren que el glutamato y ACh no colocalizan, sino que se segregar a distintos botones sinápticos (Nishimaru et al., 2005). Por otro lado, el grupo de Trudeau ha considerado la pérdida de coexistencia de neurotransmisores en las neuronas del mesencéfalo como segregación de moléculas transmisoras. (El Mestikawy et al., 2011), el grupo de trabajo de este mismo investigador publicó recientemente un trabajo donde muestra la segregación de serotonina y glutamato en la neuronas mesencefálicas (Voisin et al, 2016). El año pasado en un trabajo muy elegante, por medio de microscopía electrónica y optogenética, se demostró como las neuronas del área ventral tegmental (AVT) son capaces de distribuir de manera heterogénea al glutamato y dopamina a distintos tipos de sinapsis, lo cual es prueba inequívoca de segregación. (Zhang et al., 2015).

Con respecto al sistema nervioso periférico en 1986 Lindh muestra la presencia de varicosidades preganglionares simpáticas encefalinérgicas carentes del marcador colinérgico. Diez años después Morales et al (1995) al confirmar la presencia de estas varicosidades pregangliones simpáticas que expresan encefalina pero no el marcador colinérgico sugiere la posibilidad de que la ACh se segregue en un subgrupo de botones encefalinérgicos. Posteriormente en la primera década del 2000, el grupo de Morales continuó investigando la segregación en las neuronas preganglionares simpáticas (NPS), así Jiménez en 2002 y Sámano en el 2006 y 2009 demuestra que las NPS, coexpresan ACh y otros neuropéptidos como la metionina encefalina (mEnk) en sus somas pero que el 40% de las varicosidades que expresan mENK fueron negativas al marcador colinérgico, lo que indicaba que las NPS tienen la capacidad de segregar su transmisor clásico la ACh de sus co-transmisores peptidérgicos (Jiménez et al, 2002; Sámano et al., 2006, 2009).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos por el grupo de Morales et al., surge la pregunta si en el SNP existe también segregación entre NTs clásicos, como en el SNC. Una de las primeras evidencias de esta posibilidad de segregación de NTS clásicos en neuronas simpáticas fue presentado por Landis et al., en un co-cultivo de neuronas ganglionares y miocitos cardíacos donde las neuronas ganglionares adrenérgicas sufren un cambio de fenotipo a colinérgico, observaron por medio de análisis de microscopía electrónica que aproximadamente un tercio de botones sinápticos, contenían solo vesículas adrenérgicas, lo que sugería una segregación de ACh y NA (Landis et al., 1976). Aunque Landis propuso esta posibilidad de segregación, finalmente se inclinó por la alternativa de que por razones técnicas en estos botones no se podía distinguir las vesículas colinérgicas. No fue sino hasta 2010 con el trabajo del grupo de Morales y colaboradores (Vega et al, 2010) en el que se confirma en el mismo modelo que Landis utilizó la segregación de ACh y NA, ya que se encontró que los marcadores adrenérgicos y colinérgicos, el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2) y el de ACh

(VAcHT) coexisten en los somas de las neuronas ganglionares, mientras que en las terminales nerviosas VMAT 2 esta ausente en 47 % de los botones sinápticos que contienen a VAcHT, mostrando por primera vez en un modelo *in vitro* y por medio de estudios morfológicos que los neurotransmisores clásicos en las neuronas simpáticas también se segregan a distintas varicosidades .

Debido a la evidencia recopilada de segregación de transmisores clásicos, *in vivo* en el SNC e *in vitro* en el SNP, surge la pregunta de si la segregación de transmisores clásicos también ocurriría *in vivo* en el SNP, pregunta que se aborda en éste trabajo. Para ello se eligió a las NPS ya que se sabe que además de sintetizar ACh también sintetizan GABA según los trabajos de Wolff y colaboradores (Wolff 1978; Kasa et al., 1988; Wolff et al., 1989) quienes observaron inmunoreactividad a GABA en el ganglio cervical superior y más recientemente a los de Ito y colaboradores quienes por medio de inmunofluorescencias, marcaje retrógrado, denervación y marcaje anterógrado demuestran de una manera fina la existencia de GABA en dichas neuronas (Ito et al., 2007).

A partir de toda la evidencia recolectada, se puede proponer que las neuronas tienen la capacidad de segregar sus transmisores a sus diferentes procesos neuronales. La otra posibilidad es que los neurotransmisores se almacenen y liberen en sus botones sinápticos a través de la coexistencia, lo cual significaría que en todas las varicosidades de una neurona se encuentra la misma combinación de moléculas transmisoras. Cabe mencionar que los grupos que apoyamos la segregación no descartamos la posibilidad de que en algunos botones coexistan ambas moléculas transmisoras.

Finalmente, ¿cuál podría ser el papel funcional de la segregación? Una hipótesis es que a través de segregar sus transmisores, las neuronas logran modular mejor la liberación de neurotransmisores, que incluso podría estar relacionado con los requerimientos del órgano blanco o neurona postsináptica.

4.5 Presencia de GABA en las Neuronas Preganglionares Simpáticas (NPS) y distribución topográfica ganglionar de las varicosidades GABAérgicas

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC), se sintetiza a partir del glutamato por medio de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) y su liberación al espacio sináptico es dependiente de Ca^{2+} . Una vez liberado interactúa con sus receptores, los cuales son de dos tipos: GABA_A y GABA_C (receptores ionotrópicos, con permeabilidad al Cl⁻) (Johnston, 1996) y GABA_B (receptor metabotrópico, dependiente de proteínas G) (Bowery & Enna, 2000). La presencia de GABA en el SNC se demostró desde hace varias décadas (Curtis et al., 1968), mientras que en el SNP comenzó un par de años después con trabajos de De Groat en los que estudia el rol inhibitorio de GABA en ganglios parasimpáticos (De Groat, 1970).

Durante los años 70s, los trabajos de Adams & Brown son una de las primeras evidencias que sugieren que el GABA podría funcionar como molécula despolarizante, al parecer éstos datos contradictorios se deben al potencial de reposo de las neuronas en las cuales se realizaron los experimentos (Adams & Brown, 1975). Poco después Bertilson también observa la presencia de GABA en el GCS (Bertilson et al., 1976).

En los años 80s el grupo de Wolff y colaboradores trabajaron con este neurotransmisor en las NPS; observaron inicialmente la presencia de GABA en el ganglio cervical superior y, al igual que Bertilson, concluyen que el GABA se encuentra exclusivamente en el tejido conectivo del ganglio. Sin embargo, tiempo después el mismo grupo demuestra la presencia de GABA en fibras preganglionares y realiza un mapa de distribución de la molécula transmisora, concluyendo que es la zona rostral del GCS la que tiene mayor cantidad de inervación preganglionar GABAérgica (Wolff et al., 1989; Wolff et al.,

1993). Para demostrar el origen del GABA, Kasa en 1988 cortó el tronco preganglionar y observó la desaparición de las fibras GABAérgicas en el GCS, asegurando de ésta manera que el GABA es de origen neuronal y no glial (Kasa et al., 1988). Recientemente, se demostró de manera muy fina y elegante la existencia de GABA en las neuronas preganglionares simpáticas por medio de inmunofluorescencia, hibridación *in situ* y marcajes retrógrados. (Ito et al., 2005; 2007).

Se sabe que las neuronas ganglionares se distribuyen en el GCS principalmente en dos regiones la rostral y la caudal y que cada población usa un nervio postganglionar específico para alcanzar sus respectivos blancos, las neuronas rostrales el nervio carotídeo interno (NCI) y las caudales el carotídeo externo (NCE). Como ya se menciona Wolf y colaboradores encontraron un gradiente rostro-caudal de las varicosidades GABAérgicas y argumentaron sobre la posibilidad de participación de la modulación GABAérgica en la regulación de la actividad de las neuronas vasomotoras ganglionares, debido a la mayor cantidad de fibras GABAérgicas de la zona rostral y a que dichas neuronas se localizan en esa región. En este trabajo analizamos de manera sistemática la posible correlación funcional del GABA con su gradiente de distribución regional.

Por otra parte también se ha estudiado el papel del GABA en un protocolo de plasticidad sináptica, la potenciación a largo plazo (LTP). Gonzales-Burgos (1997) encontró que el antagonista a GABA, la picrotoxina (100 μ M) rescata un tipo de LTP bloqueada por GABA concluyendo que GABA podría regular la transmisión ganglionar a nivel presináptico posiblemente modulando la liberación de ACh. (González- Burgos et al., 1997).

5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

De acuerdo a los antecedentes nos hicimos las siguientes preguntas: ¿ las neuronas preganglionares simpáticas *in vivo* segregan a sus neurotransmisores clásicos, particularmente ACh y GABA? ¿La distribución regional del GABA se correlaciona con los niveles de modulación inhibitoria ganglionar? De existir segregación entre ACh y GABA, ¿mostrarán GABA y ACh algún gradiente de distribución, y si es así, se reflejará este gradiente en la modulación GABAérgica ganglionar simpática?

6. HIPÓTESIS

Las neuronas preganglionares simpáticas segregan a sus neurotransmisores clásicos (GABA- ACh) a distintos botones sinápticos. La segregación muestra un patrón regional heterogéneo que se correlaciona con diferencias topográficas de la modulación GABAérgica.

7. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar si en las NPS existe segregación entre transmisores clásicos (GABA-ACh). Caracterizar la expresión y función del GABA, así como su segregación de ACh. Determinar diferencias regionales en la segregación y su posible correlación funcional.

OBJETIVOS PARTICULARES MORFOLÓGICOS

1. Caracterizar la expresión, co-expresión y segregación de marcadores GABAérgicos y colinérgicos.
2. Explorar la posible regionalización GABAérgica y la segregación regional
3. Caracterizar la población de neuronas ganglionares innervada por GABA.

OBJETIVOS PARTICULARES FUNCIONALES

2. Analizar el efecto del GABA en la transmisión sináptica ganglionar.

8. METODOLOGÍA

Los animales utilizados en este trabajo se obtuvieron de la Unidad de modelos biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); los experimentos fueron realizados en ratas Wistar macho (200-250g), los cuales fueron tratados de acuerdo a las guías éticas para el cuidado y el uso de animales en laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos y aprobados por nuestro comité institucional para el cuidado y uso de animales en laboratorio. Para realizar los experimentos las ratas fueron anestesiadas con xilacina (10mg/kg i.m) y ketamina (90mg/kg i.p).

I. PROCEDIMIENTOS HISTOLÓGICOS

Para la denervación ganglionar, el tronco torácico simpático (TTS) fue expuesto y cortado de 3-5 mm caudal al ganglio (Figura 3). Posterior al procedimiento quirúrgico, los animales tuvieron cuidados postoperatorios durante 3 días. Para llevar a cabo el marcaje de las NPS y de las neuronas ganglionares, el trazador Fluoro Gold (FG) (Fluorochrome, LLC, Denver, CO) o DAPI al 3% (Sigma, St. Louis, MO, USA) fueron aplicados en el extremo distal del TTS o en los nervios carotídeos, respectivamente, por medio de una pipeta de vidrio (Figura 4). Para bloquear el transporte axonal de las NPS seguimos el procedimiento utilizado por Albuquerque et al., 1972, en el cual se introduce un catéter en la región de la unión atlantooccipital hasta los segmentos cervicales 6to al 8vo y se inyecta lenta e intratecalmente de 10-16 μg de colchicina a (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en solución salina) (Figura 5). Para realizar las inmunohistoquímicas del GCS, las ratas fueron anestesiadas profundamente con pentobarbital sódico (125 mg/kg i.p) después de 7 días de haberse llevado a cabo la denervación, 3 días (en el caso de marcadores retrógrados de las neuronas ganglionares) y 5 días (para el marcaje retrógrado de las NPS y el tratamiento con colchicina).

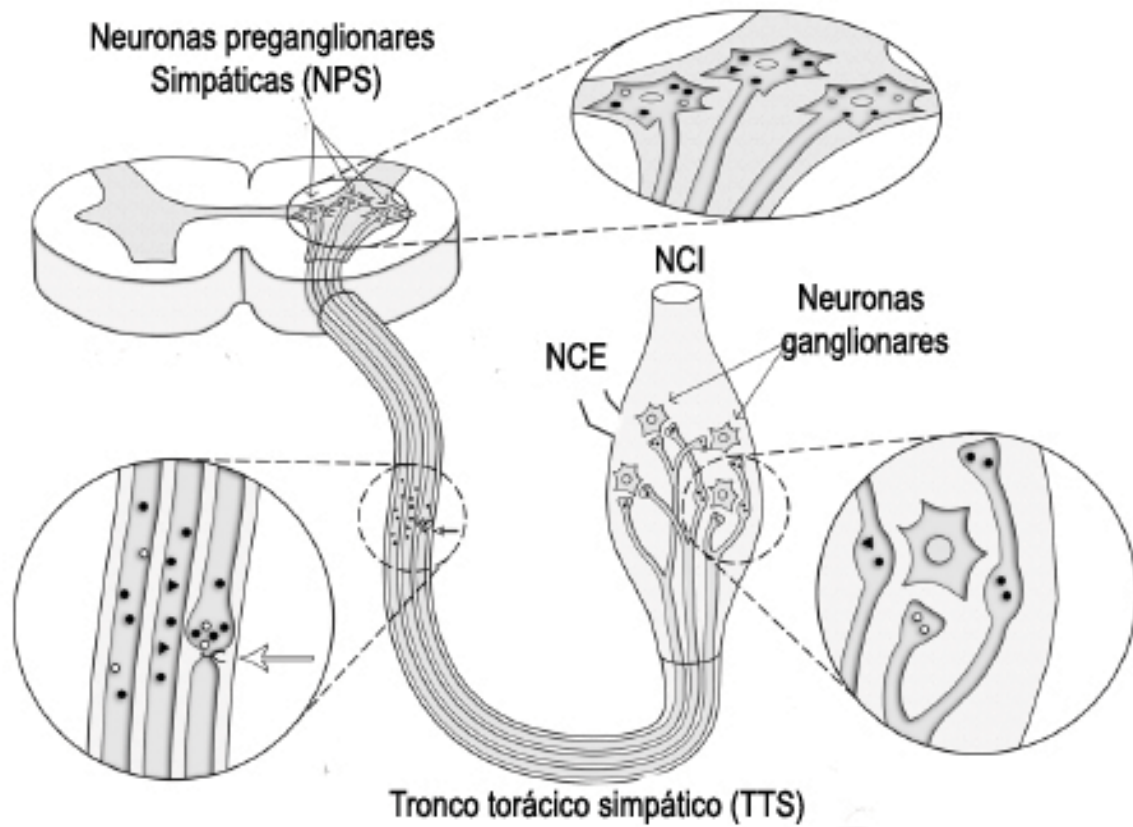


Figura 3. Esquema de neuronas preganglionares simpáticas (NPS) y neuronas ganglionares. Se muestran los somas de las NPS situadas en el núcleo intermedio lateral de la médula (nIML), éstas neuronas envían sus axones y terminales nerviosas al ganglio cervical superior (GCS), en donde conectan con las neuronas ganglionares. Se muestra el Tronco torácico simpático (TTS) y se muestran los nervios de salida del ganglio (NCI y NCE). Modificada de Sámano et al., 2010.

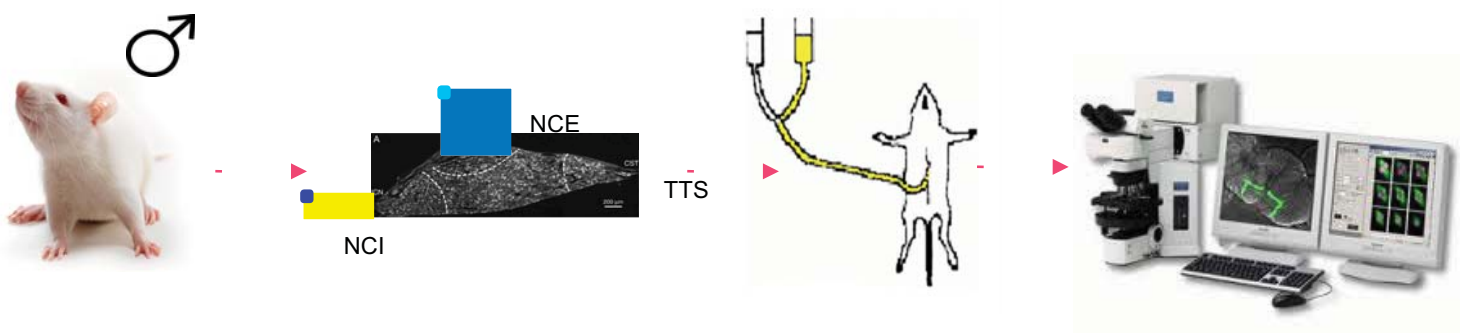


Figura 4. Marcaje de las neuronas ganglionares, la pipeta con el trazador Fluorogold se ejemplifica con el rectángulo amarillo, mientras que el DAPI 3% se observa en el cuadro azul.

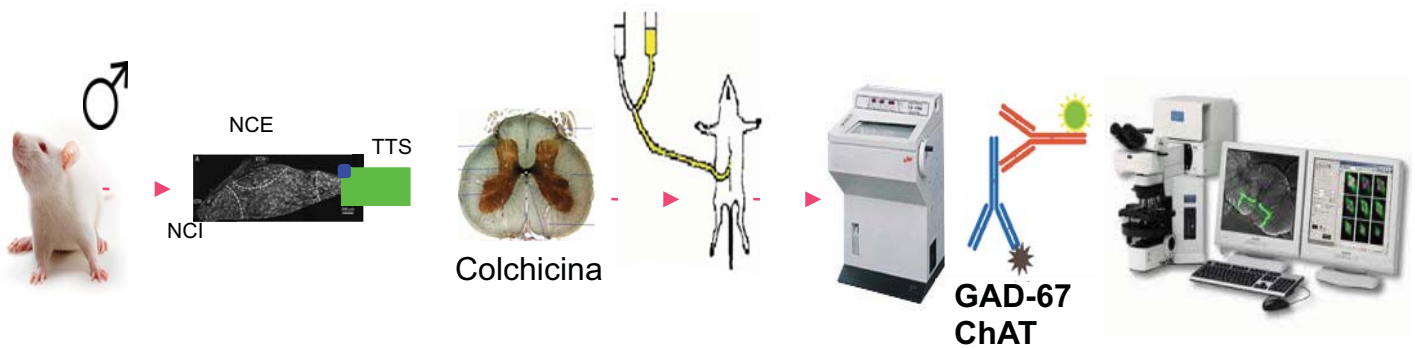


Figura 5. Bloqueo de transporte axonal, por medio de colchicina, en las NPS y marcaje de las NPS por medio de fluorogold. El rectángulo verde ejemplifica la pipeta de vidrio con fluorogold colocada en el Tronco Cervical simpático para marcar de manera retrógrada las NPS.

Para los experimentos de microscopía de fluorescencia, después de anestesia profunda, las ratas fueron perfundidas transcárdialmente con 100 mL de buffer de fosfatos frío (0.01 M PBS, pH 7.4) por 3 minutos, y posteriormente con 250 mL de solución fijadora (2% de paraformaldehído, 0.18% de ácido pícrico en 0.1 M PBS, pH 7.4), 100 mL por 3 minutos y los 150 mL restantes por 40 minutos. El GCS y los segmentos de la médula espinal (C7-T3) fueron disecados, postfijados toda la noche en la misma solución fijadora y crioprottegidos en una solución de sacarosa (10-30% p/v). Secciones transversales y longitudinales de la médula espinal y secciones longitudinales del GCS (14 μm de grosor) fueron cortados utilizando un crióstato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, recuperados en laminillas cargadas Superfrost Plus (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) y procesadas a temperatura ambiente en una atmósfera húmeda con una técnica de rutina para inmunohistoquímica sencilla o doble. Las secciones de tejido fueron preincubadas por 2 horas con suero de albúmina bovina al 10% para todos los inmunomarcajes o con suero de burro al 10% para GAD67 (Figura 6).

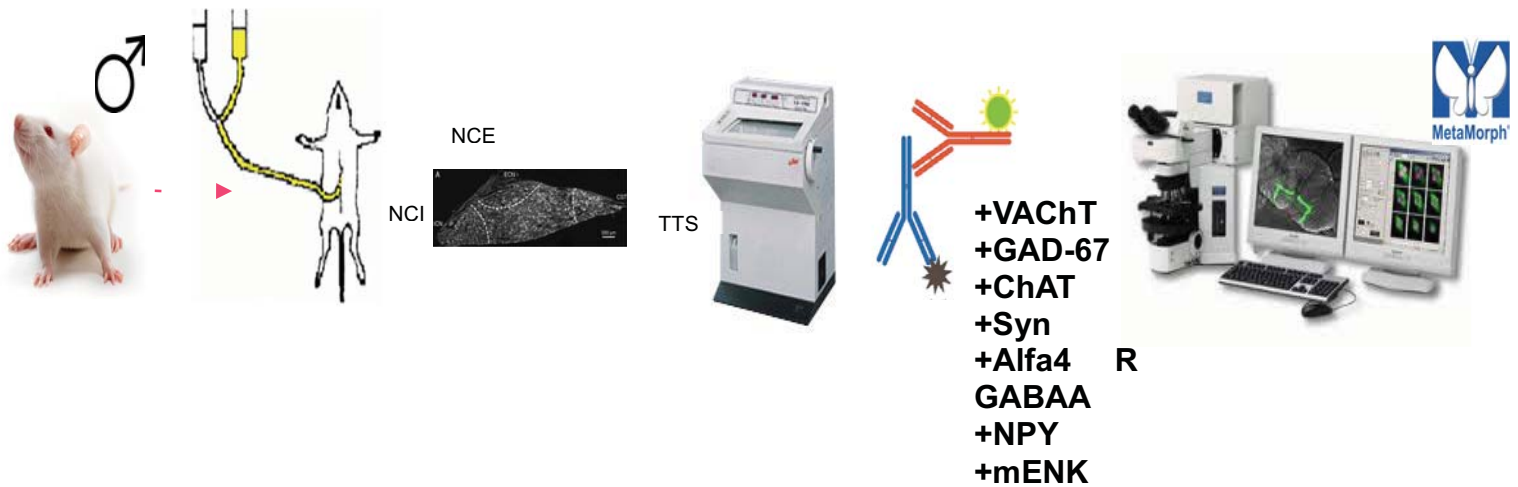


Figura 6. Procedimiento de inmunohistoquímica en GCS. De izquierda a derecha: (1) Rata macho, (2) Se perfunde rata, (3) Se obtiene el ganglio (4) Se obtienen cortes longitudinales de 14 micras en un criostato, (5) Se colocan anticuerpos primarios, (6) son observados en microscopia confocal y analizados por metamorph.

Posteriormente las secciones fueron incubadas toda la noche con anticuerpos policlonales dirigidos contra ChAT, VACHT, Sinaptofisina (Syn), mENK, neuropéptido Y (NPY) y la subunidad $\alpha 4$ del receptor a GABA_A (R $\alpha 4$ GABA_A) o monoclonales anti GAD67 diluído en suero de burro al 10% (Tabla 1). Debido a la baja eficiencia del anticuerpo primario contra el GAD67, los cortes correspondientes fueron preincubados en solución de citratos Immuno DNA Retriever (1:20; Bio Sciences for the World, Santa Bárbara, CA, USA) por 1 h a 70°C. Las secciones de tejido fueron lavadas dos veces por 10 minutos, cada lavado con PBS Tritón X-100 (0.1 M PBS, 0.3% Tritón X-100), y posteriormente incubados 2h con el anticuerpo secundario apropiado (Tabla 1). En ambos tejidos, como control previo al procedimiento del inmunomarcaje, los anticuerpos primarios fueron preadsorbidos toda la noche a temperatura ambiente con un exceso molar de 10 veces de sus antígenos controles correspondientes, 3.0 μ M para GAD67 (Gene Tex, Irvine , CA, USA); 0.1 μ M para ChAT (Chemicon, Temecula, CA, USA) y 1 μ M para el resto (mENK, Sigma St Louis, MO, USA; Syn Abcam, Cambridge, MA, USA; GAD 67 Millipore, Chemicon Billerica, MA, USA).

Como otro control, algunas secciones de tejido fueron procesadas todos los pasos de incubación, sin embargo los anticuerpos primarios no se colocaron. Finalmente las secciones fueron cubiertas con medio de montaje para fluorescencia (Dako Fluorescent Mounting medium, Dako, Santa Clara, CA, USA) y examinados con un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600), equipado con los filtros apropiados para Alexa 488, Alexa 594 y Cy5. Cortes seleccionados con uno o dos marcajes fueron analizados posteriormente con un microscopio confocal LSM 5 Pascal Zeiss equipado con un láser argon/Krypton. Las imágenes fueron capturadas con un objetivo 40x (1.3 NA/Oil), las imágenes confocales fueron obtenidas utilizando por lo menos dos canales fotomultiplicadores separados, ya sea juntos o en corridas separadas.

| Antisuero | Tipo de anticuerpo | Acoplado a | Dilución | Fuente | Catalogo núm. |
|------------------------------|--------------------|------------|----------|---------------------------------|------------------|
| Primario | | | | | |
| VChT (rata) | Policlonal Cabra | ---- | 1:100 | Promega Corp, Madison, WI, USA | ab27941 |
| ChAT (humano) | Policlonal Cabra | ---- | 1:100 | Millipore, Chemicon, MA, USA | AB144P |
| mENK (bovino) | Policlonal conejo | ---- | 1:100 | Millipore, Chemicon | AB5026 |
| Synaptofisina (humano) | Policlonal conejo | ---- | 1:200 | Dako Cytomation, Denmark | A0010 |
| GAD 67 (synthetic) | Policlonal ratón | ---- | 1:200 | Millipore, Chemicon | MAB5406 |
| NPY | Policlonal conejo | ---- | 1:200 | Bachem, CA, USA | T4070 |
| α 4 GABA A | Policlonal conejo | ---- | 1:200 | Sigma | 69169 |
| Secundario | | | | | |
| α cabra IgG | Burro | Alexa 488 | 1:500 | Jackson ImmunoResearch Lab, Inc | 705-545-003 |
| α conejo IgG | Burro | Alexa 488 | 1:500 | Jackson ImmunoResearch Lab, Inc | 711-545-152 |
| α ratón IgG | Burro | Alexa 594 | 1:700 | Jackson ImmunoResearch Lab, Inc | 715-515-150 |
| α ratón biotinilado | | | 1:200 | Vector Laboratories | BA-2000 |
| Avidina Conjugado HRP (ABC). | | | 1:100 | Vector Laboratories | PK-6100 |

Tabla 1. Anticuerpos utilizados durante la inmunohistoquímica.

Para el análisis en microscopía electrónica de transmisión (TEM), las ratas fueron anestesiadas profundamente y perfundidas transcárdialmente con buffer de fosfatos de sodio frío (PB; 0.1 M, pH 7.4) seguido de una solución fijadora (paraformaldehído 4% y glutaraldehído en PBS al 1%). Después de la perfusión, el GCS fue removido, postfijado por 2 h a 4 °C en el mismo fijador y transferido a PBS. Luego, el ganglio fue permeabilizado por una breve exposición a nitrógeno líquido seguido de una solución de sacarosa al 30% y regresado al PBS. Se obtuvieron cortes en vibratomo (30 µm de grosor) y fueron inmunoprocésadas por flotación en cajas de cultivo celular (24 pozos). Primero se lavaron en 0.1M PBS e incubaron en una solución de borohídrido de sodio al 1% por 15 minutos. Posteriormente, las secciones fueron lavadas en PBS 0.1 M, tratadas con suero de cabra al 10% por 30 minutos, e incubados por 24 horas con el anticuerpo primario contra GAD 67, 1:100 en PBS 0.1 M con suero de cabra al 3%. Las secciones seriales fueron lavadas tres veces en PBS, incubados en IgG anti ratón- biotinilado de caballo (1:200 , Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 2 horas, lavados con PBS y posteriormente tratados con conjugado de avidina para peroxidasa (para formar complejos de biotina-avidina; ABC, 1:100;Vector) por una hora

Las secciones fueron lavadas en PBS y la actividad de la peroxidasa fue revelada con 3,3'-diaminobenzidina al 0.05% y peróxido de hidrógeno al 0.01% en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. A las secciones se les realizó una contratinción con acetato de uranilo al 10% por 1 hora, luego se postfijaron por una hora en OsO₄ al 1%, se deshidrataron en gradientes crecientes de etanol y se embebieron en Epon entre cubreobjetos plásticos. Después de toda la noche, los cortes fueron analizados en microscopía de luz y las regiones con el inmunomarcaje más evidente fueron seleccionadas para incluir en bloques de Epon y posteriormente obtener cortes semifinos de 3 µm para microscopía de luz y finos de 60 nm para Microscopía Electrónica. Los cortes fueron contrateñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo y finalmente examinados en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1100 TEM.

II. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y ELECTROFISIOLÓGICOS.

Las ratas fueron anestesiadas con xilazina (10 mg/kg i.m) y ketamina (90 mg/ kg i.p), luego el ganglio fue rápidamente extraído y liberado cuidadosamente de su cápsula. Las raíces de los nervios postganglionares y preganglionares fueron cortados a una longitud de 3 a 5mm, y el ganglio fue transferido a una cámara de registro (Warner Instruments, Hamden, CT, USA) y bañado con solución Ringer- krebs oxigenada (95% O₂; 5 % CO₂), pH 7.4, contenido (en mM): 136 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1 KH₂PO₄, 12 NaHCO₃, 11 glucosa y 2 μM de atropina. Todos los experimentos fueron realizados en una temperatura controlada de 24± 0.5 °C. Para registro y estimulación, el TTS (nervio preganglionar) y uno de los dos nervios postganglionares, el carotideo interno y/o el externo (NCI y NCE), fueron succionados dentro de electrododos de vidrio para mantener un sello durante el registro. (Figura 7). Los estímulos fueron aplicados por un estimulador Pulsar 6i (FHC Inc, Bowdoin, ME, USA) y consistieron en pulsos de voltaje cuadrados supramáximos (9-12 V) de 0.1 ms duración a 0.2 Hz. Los potenciales de acción compuestos (PACs) fueron registrados del NCI y NCE, los trazos de voltaje fueron amplificados (100x) y filtrados por un amplificador diferencial DP-301, (Warner Instruments, Hamden, CT, USA) y digitalizados con un un sistema de adquisición de datos multifuncional (PCI-DAQ) con un convertidor A-D de 16 bits utilizando un programa de adquisición realizado en LabView v8.6 (National Instruments, Austin TX, USA). La amplitud del PAC basal fue estable de 3-4 horas.

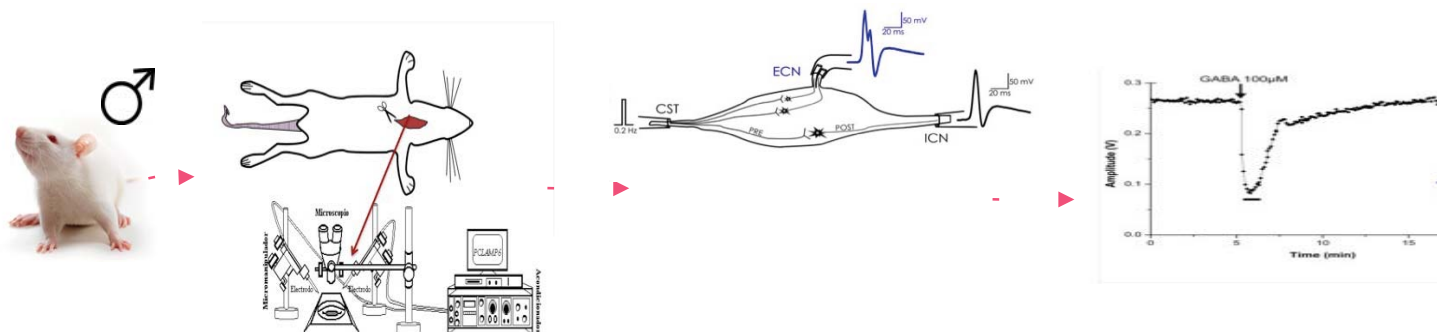


Figura 7. Esquematación sintetizada de protocolo de registro y estimulación del NCI y el NCE. Se extrae el GCS de la rata, posteriormente es colocado en la cámara de registro para ajustarle electrodos de estimulación y de registro.

Las curvas de entrada/salida (I/O) fueron construidas con base a la amplitud de los registros de los PACs (salida) obtenidos, ya sea en el NCE o en el NCI, en respuesta al incremento progresivo de las intensidades de estímulo (entrada). Se evaluaron las curvas al ajustarlas a una función logística del tipo $V_o = VM / [1 + ((VM/V_0) - 1) * e^{-\alpha V_i}]$ (Banks, 1994), donde V_o es el voltaje de salida, VM = la respuesta máxima, V_0 = la respuesta inicial (en nuestro caso 0.005), V_i = voltaje de entrada y coeficiente α relacionado a la pendiente. El valor de la estimulación que produjo el 50% de la respuesta lo obtuvimos por interpolación sobre la gráfica.

Para evaluar la sensibilidad al $RGABA_A$ determinamos la CI_{50} a partir de curvas dosis-respuesta. El GABA (Sigma Chemical co, St Louis, MO, USA) fue preparado en solución Ringer-Krebs fresca. Para evaluar el efecto del GABA, se registraron los PACs durante 3-5 minutos, después el GABA fue administrado a concentraciones indicadas y se determinó la inhibición producida. Posteriormente, la preparación fue lavada y una vez que el PAC control fue reestablecido, se esperaba 30 minutos aproximadamente antes de probar una nueva concentración de GABA de la misma manera, no más de dos concentraciones de GABA fueron evaluadas en cada ganglio, en orden azaroso.

Para evaluar las diferencias regionales en la velocidad de desensibilización a GABA, y la sensibilidad del RGABA_A al antagonista competitivo picrotoxina (PTX), comparamos las respuestas del NCE y el NCI de la siguiente manera: primero administramos 250 μ M de GABA y comparamos la velocidad de desensibilización de la respuesta inhibitoria máxima en el NCI y en el NCE. Para evaluar la sensibilidad del RGABA_A a PTX, administramos 20 μ M de PTX y 5 minutos después 250 μ M de GABA, determinamos el nivel de inhibición de GABA con y sin presencia de PTX. La sensibilidad al antagonista fue evaluada también en la plasticidad ganglionar, para ello por medio de estimulación submáxima, se aplicó un “tren” de estímulo inductor de LTP de 20 Hz, 20 s para inducir una potenciación post-tren, y después administramos 50 μ M de PTX y se repitió el protocolo. Para comparar la potenciación, determinamos la amplitud de la respuesta a los 30 y 60 minutos después del tren, así como el área bajo la curva de las amplitudes de las respuestas postren en ambos nervios (NCI y NCE).

III. MUESTREO, MEDICIÓN DE COLOCALIZACIÓN Y ESTADÍSTICA

Cada ganglio fue seccionado longitudinalmente a lo largo de su eje lateral (800 μ m) para generar de 40-50 cortes. Muestreamos el tejido al coleccionar por lo menos 5 cortes en tres profundidades (140-210, 350-420 y 560-630 μ m desde el borde del ganglio) y coleccionamos cada serie de 3 cortes en diferentes laminillas. Para cada ganglio seleccionamos aleatoriamente un corte y analizamos el área completa al escanearla con un microscopio confocal LSM 5 Pascal Zeiss. Para cada imagen seleccionamos un solo plano focal. Después de la reconstrucción virtual de cortes, por medio del sistema de análisis de imágenes de Metamorph (v. 7.5.6 ; Universal Imaging Corporation, Molecular Devices, Downingtown, PA, USA), eliminamos el ruido de fondo por medio de funciones de deconvolución. Posteriormente identificamos marcas específicas al seleccionar la densidad óptica (DO) que sobresale sobre la marca de fondo (p.e DO > promedio del fondo +2 DE). Cuantificamos el número de pixeles superpuestos para

cada marcador en las varicosidades con doble inmunomarca. La colocación es presentada como la razón del porcentaje de las fibras que coexpresan las dos marcas, relativo al porcentaje de fibras que sólo expresan un marcador. Es por ello que la razón de uno corresponde a la colocación completa mientras que la de cero representa localización completamente independiente. La segregación de dos marcas fue representada como el porcentaje del total de varicosidades positivas a un marcador (p.e. GAD67) que no expresan un segundo marcador (VAChT). Entonces, un nivel de 100% de segregación indica que ninguna de las varicosidades positivas a un marcador expresan al segundo, mientras que 0% indica que todas las varicosidades positivas a un marcador co-expresan al segundo. Utilizamos cuatro ratas para realizar el inmunomarcaje del R GABA_A y tres animales por cada marcaje retrógrado. Cinco animales fueron utilizados para todos los grupos experimentales de inmunomarcajes. Para los experimentos electrofisiológicos siete ratas fueron utilizadas para las curvas I/O y cinco para las curvas de dosis-respuesta.

Para identificar por cual nervio carotideo, NCI o NCE, salen los axones de las neuronas ganglionares de cada región aplicamos diferentes trazadores retrógrados en cada uno de los dos nervios carotídeos, y determinamos la localización regional de los somas marcados con cada trazador. Posteriormente, en otra serie de experimentos se combinó el inmunomarcaje a GAD67 y marcadores retrógrados, y analizamos por medio de que nervio las neuronas densamente contactadas por GABA enviaban sus axones.

Para cuantificar los somas de las NPS que expresan GAD67 y ChAT en la médula espinal, cortamos la médula transversalmente a los niveles de las salidas de las raíces nerviosas o longitudinalmente. Cuantificamos el número de somas positivos a GAD 67 o ChAT , o para los dos marcadores (colocalización) en el núcleo intermedio lateral (nIML). Los datos fueron expresados como promedios \pm SEM. El nivel de significancia para las diferencias entre los promedios fue evaluado ya sea por una t-student independiente, o en el caso de distribución de la colocalización a lo largo de las regiones ganglionares con una ANOVA de una vía independiente seguido por una prueba de Tukey pots hoc. El nivel de significancia fue fijado a $P < 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1. Presencia de GAD67 en somas y botones sinápticos de las neuronas preganglionares simpáticas (NPS).

En la médula espinal de las ratas tratadas con colchicina, la inmunoreactividad a GAD67 (GAD67-IR) fue detectada en los cuerpos celulares de las neuronas preganglionares simpáticas, las cuales se localizan en el núcleo intermedio lateral (nIML) de la médula a nivel torácico, y miden aproximadamente 20 micras. Para comprobar que efectivamente marcamos neuronas preganglionares hicimos marcaje retrógrado con Fluorogold (FG), a través de los axones preganglionares y observamos que casi todas las neuronas GAD67 positivas colocalizan con el FL, confirmando su identidad preganglionar. (Figura 8) Además de éstas neuronas inmunopositivas se encontraron bastantes varicosidades positivas a GAD67 que rodeaban a las NPS (Figura 8D, F).

Por otro lado, los botones sinápticos de éstas neuronas se localizan en el GCS, ahí observamos que la inmunoreactividad a GAD67 tiene una distribución rostro-caudal ($79 \pm 6\%$ en la rostral vs $21 \pm 3\%$ en la caudal; $P < 0.02$; Figura 9). En el GCS observamos dos tipos de fibras positivas a GAD67 que muestran las siguientes características: (1) varicosidades que forman varios anillos que rodean a las neuronas ganglionares ($80 \pm 2\%$; Figura 9B1) y (2) fibras dispuestas tangencialmente a los lados de las somas de las neuronas ganglionares ($20 \pm 3\%$; Figura 9B2). La presencia de neuronas ganglionares contactadas por varicosidades GAD positivas nos llevó a generar un término para identificarlas, las nombramos neuronas densamente contactadas por GABA (células DCG). Estas observaciones concuerdan con aquellas realizadas por Wolff (1989) en la que observaron que la distribución de GABA no es uniforme sino que se acumula en un gradiente rostro-caudal, además observaron también

varicosidades positivas a GABA con patrones en forma de canasta localizadas alrededor de una subpoblación de neuronas ganglionares, a las que nombraron neuronas ricamente inervadas por GABA; RIG neurons; Wolff et al., 1989).

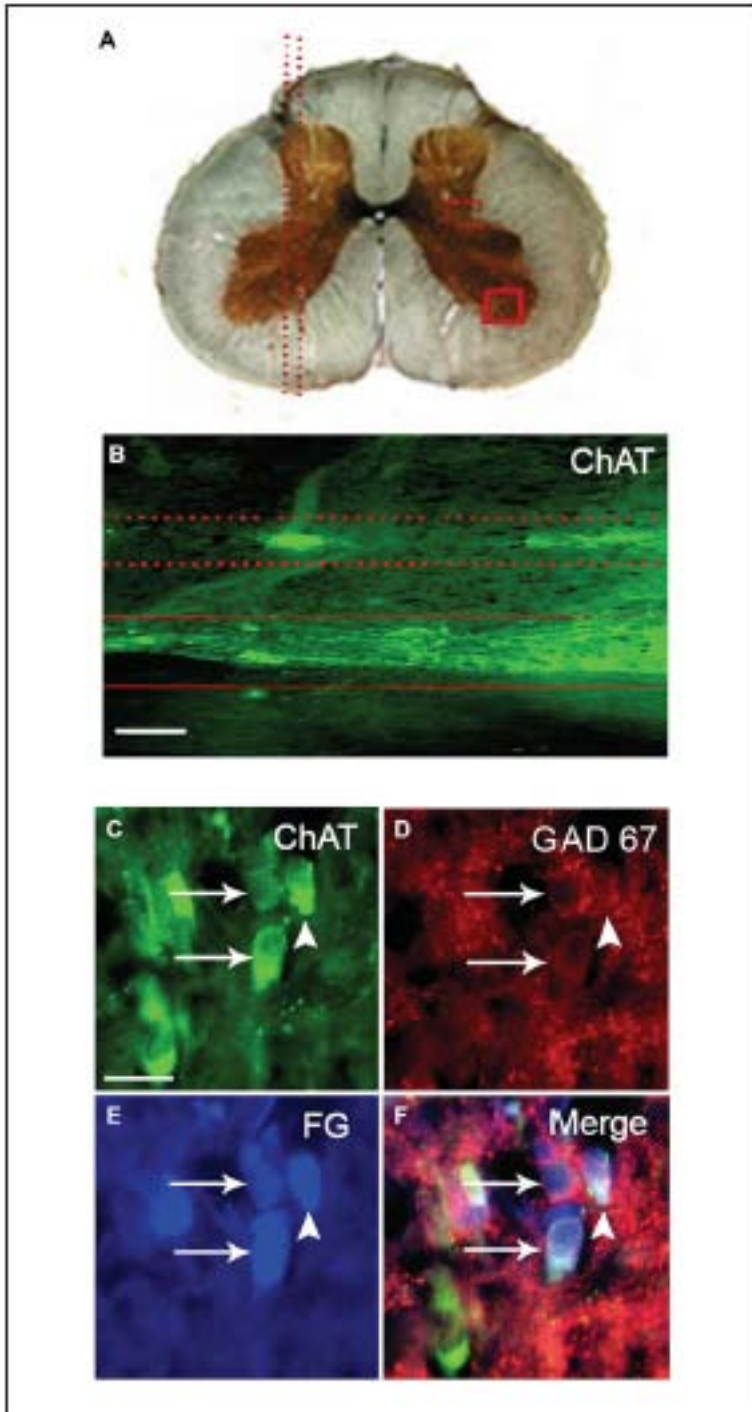


Figura 8. Todas las neuronas que son inmunopositivas a GAD 67 y al marcador retrógrado (Fluorogold), coexpresan ChAT. **A:** Esquematización de la médula espinal a nivel torácico, indica la forma en que se cortó el tejido y la zona en la que se encuentran las NPS, en la hemimédula del lado izquierdo las líneas punteadas representan la forma de corte para las secciones longitudinales; en la hemimédula del lado derecho, el rectángulo de las líneas punteadas indica el lugar de las NPS y el de líneas continuas una zona de las astas ventrales de la médula espinal. **B:** Sección longitudinal que muestra a las NPS (ubicadas en el rectángulo de las líneas punteadas) y las neuronas motoras (ubicadas en el de líneas continuas). **C-F:** Inmunohistoquímica de sección transversal de médula espinal inmunomarcada con ChAT (**C**), GAD 67 (**D**), Fluorogold (**E**) y la sobreposición de los 3 canales (**F**). Las flechas muestran a las neuronas positivas a GAD 67, a ChAT y a FG; mientras que la cabeza de flecha indica la neurona positiva a FG y ChAT, y negativa a GAD 67. La barra representa 20 μm .

Debido a la existencia de fibras GABAérgicas con dos tipos de distribución celular y a la observación de mayor porcentaje de ocupación de las fibras que circundan neuronas, nos enfocamos en dicha población de fibras. Para confirmar que los botones GABAérgicos eran de origen preganglionar se denervó al ganglio al cortar por completo la entrada del tronco simpático y se realizaron inmunomarcajes para GAD67 y sinaptofisina (Syn), un marcador sináptico. Se observó que la marca a GAD67 y Syn desaparecía por completo después de denervar (Figura 9B6).

Por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión demostramos que las estructuras inmunopositivas a GAD67 mostraban todas las características ultraestructurales propias de botones sinápticos, como lo son las vesículas claras pequeñas, vesículas grandes de núcleo denso (LDCV), mitocondrias y zona activa presináptica. La imagen claramente muestra que la marca a GAD67 está presente en vesículas claras pequeñas, a pesar de que también se marcaron algunas LDCV (Figura 9B3). Además, los dobles marcajes con Syn y GAD67 muestran amplia colocalización de los marcadores, observamos que $80 \pm 3\%$ de botones positivos a GAD67 coexisten con Syn (Figura 9B4-B5), esto nos confirma que la marca GABAérgica observada se encuentra en botones sinápticos.

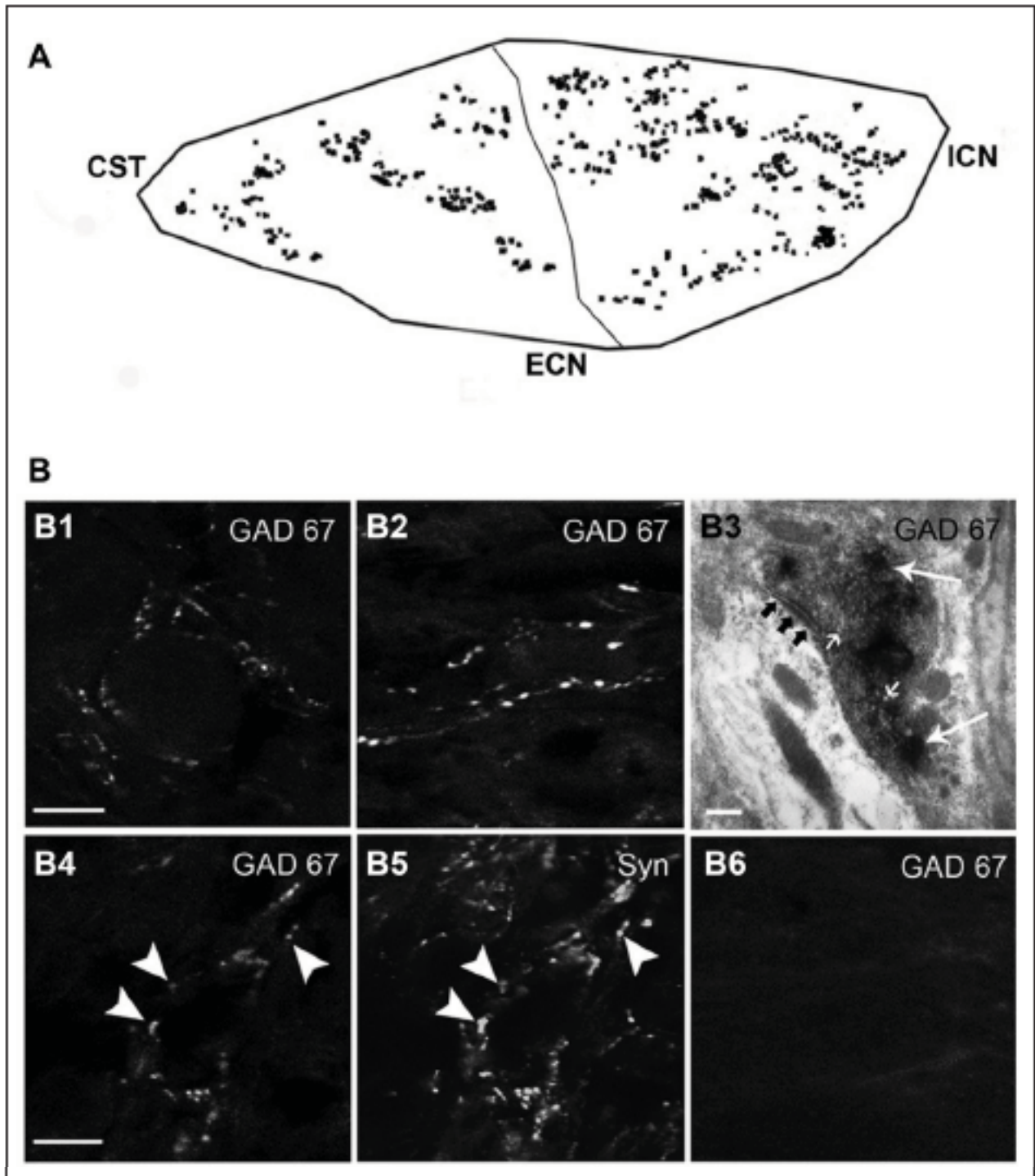


Figura 9. Las varicosidades de las NPS que contienen GAD 67, presentan una distribución rostro-caudal. **A:** Esquema que representa la distribución de la marca a GAD 67 en el GCS ($79 \pm 6\%$ rostral vs $21 \pm 3\%$ caudal; $P < 0.02$). **B:** Secciones del GCS inmunopositivas para GAD 67 (**B1-B4** y **B6**) y para Syn (**B5**). Las varicosidades positivas a GAD 67 tienen dos morfologías, concéntricas a las neuronas ganglionares (**B1**) y dispuestas de manera tangencial a las neuronas ganglionares (**B2**). Secciones de tejido procesadas para microscopía electrónica muestran que las varicosidades GABAérgicas tienen características de botones presinápticos (**B3**; vesículas pequeñas claras, y grandes de núcleo denso, flechas pequeñas y grandes y zona activa presináptica flechas negras). Los botones positivos a GAD 67 coexisten en su mayoría con Syn (**B4-B5**; cabeza de flecha). Al denervar el GCS la marca de GAD 67 desaparece (**B6**). La barra representa $20 \mu\text{m}$.

9.2. Las neuronas ganglionares expresan la subunidad $\alpha 4$ del R GABA_A.

Una vez confirmado la presencia de varicosidades positivas a GABA, investigamos la existencia del receptor a este transmisor. Además y en consideración de la distribución heterogénea de las varicosidades positivas a GAD67 nos preguntamos si también existe regionalización en la expresión del receptor. Encontramos que $56 \pm 2\%$ de las neuronas ganglionares eran inmunopositivas a la subunidad $\alpha 4$ del RGABA_A. Observamos que la distribución de la subunidad de receptor también es mayormente rostral, con $60 \pm 1\%$ de las neuronas inmunopositivas a la subunidad alfa 4 localizadas en la zona rostral, mientras que el restante $40 \pm 1\%$ se encuentran en la zona caudal ($P < 0.01$). Además observamos que la marca de la subunidad $\alpha 4$ se distribuye de manera homogénea en el cuerpo celular ya que al hacer cortes ópticos de $1 \mu\text{m}$ de grosor dentro de las neuronas ganglionares no observamos distribución intracelular específica (Figura 10).

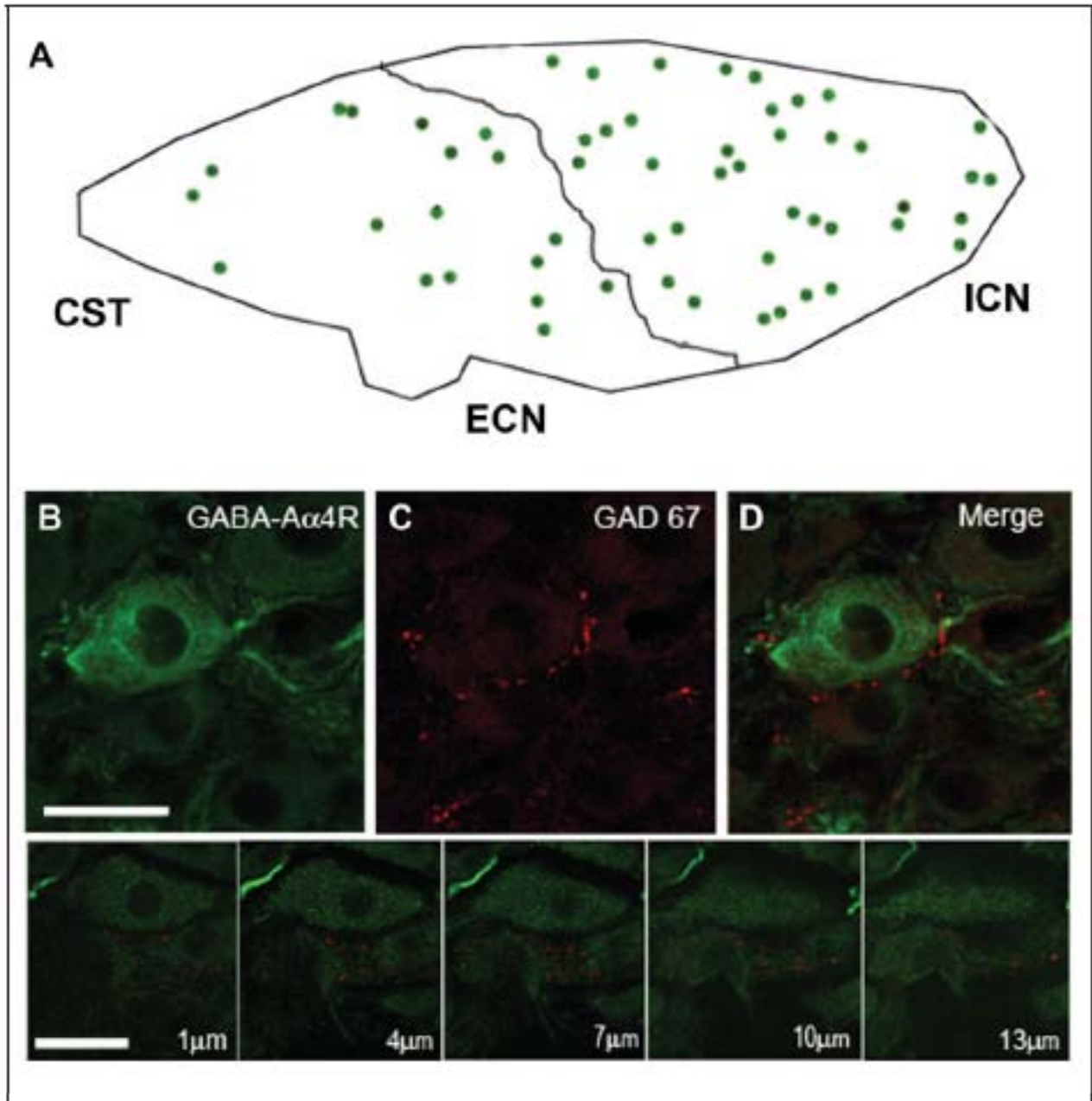


Figura 10. La subunidad alfa 4 del receptor GABA A (α_4 GABA_A) muestra una distribución mayormente rostral en el GCS. **A**: Esquema que muestra la distribución rostral del receptor GABA_A (los puntos verdes representan las neuronas marcadas). **B- D**: Cortes del GCS inmunomarcados para la subunidad alfa 4 del receptor GABA_A (**B**), GAD67 (**C**) y la sobreposición (**D**). Cortes ópticos, de 1 μ m de grosor, de microscopía confocal muestran la localización del receptor GABA_A en las neuronas (citoplásmico y membranal). La barra representa 20 μ m.

9. 3. GAD67 y ChAT coexisten en la médula sin embargo en los botones sinápticos GAD67 se localiza en botones que carecen de VACHT.

Para analizar la coexistencia entre GABA y ACh utilizamos a ChAT como marcador colinérgico en la médula espinal y a VACHT en el GCS. Decidimos utilizar marcadores colinérgicos diferentes debido a su naturaleza, ChAT (citoplásmico) y VACHT (sináptico). En la médula espinal (región torácica) analizamos la coexistencia entre el marcador GABAérgico (GAD67), colinérgico (ChAT) y marcador retrógrado FG aplicado en el tronco simpático cervical en cortes longitudinales y transversales. En ambos tipos de cortes se observó que el 100% de las NPS positivas a GAD67 coexisten con ChAT y con FG (Figura 8). Esto confirma la presencia de GABA en las NPS, y la coexistencia completa con marcadores colinérgicos y marcaje retrógrado de la vía eferente simpática.

En contraste al analizar los botones sinápticos (ubicados en el GCS), encontramos que $44 \pm 5\%$ de los botones positivos para GAD67 no tenían el marcador colinérgico, en éste caso VACHT (Figura 11). Esta discrepancia entre la completa coexistencia de ChAT y GAD67 en los cuerpos celulares de las NPS y la segregación parcial de VACHT y GAD67 en sus varicosidades no puede explicarse por una distribución azarosa simple, mas bien sugieren que las NPS segregan activamente sus transmisores clásicos ACh y GABA hacia varicosidades separadas.

Con éste dato decidimos explorar si observábamos distintos valores de segregación según el tipo de fibras GABAérgicas, pero no se encontró diferencia. Sin embargo, encontramos diferencias de segregación al analizar las distintas regiones del ganglio la rostral y la caudal. En la caudal observamos que $55 \pm 5\%$ de varicosidades positivas a GAD67 no contenían marca para VACHT mientras que en la rostral encontramos que solamente $25 \pm 4\%$ de botones sinápticos positivos a GAD67 eran negativos a VACHT ($P < 0.01$). Esto significa que existe mayor segregación de los transmisores clásicos en la zona caudal, en otras palabras las neuronas de la zona rostral reciben principalmente inervación

GABAérgica que almacenan a ambos neurotransmisores (GABA y ACh), mientras que en la zona caudal las neuronas presentan mayor invasión GABAérgica que contienen a GABA pero no VACHT.

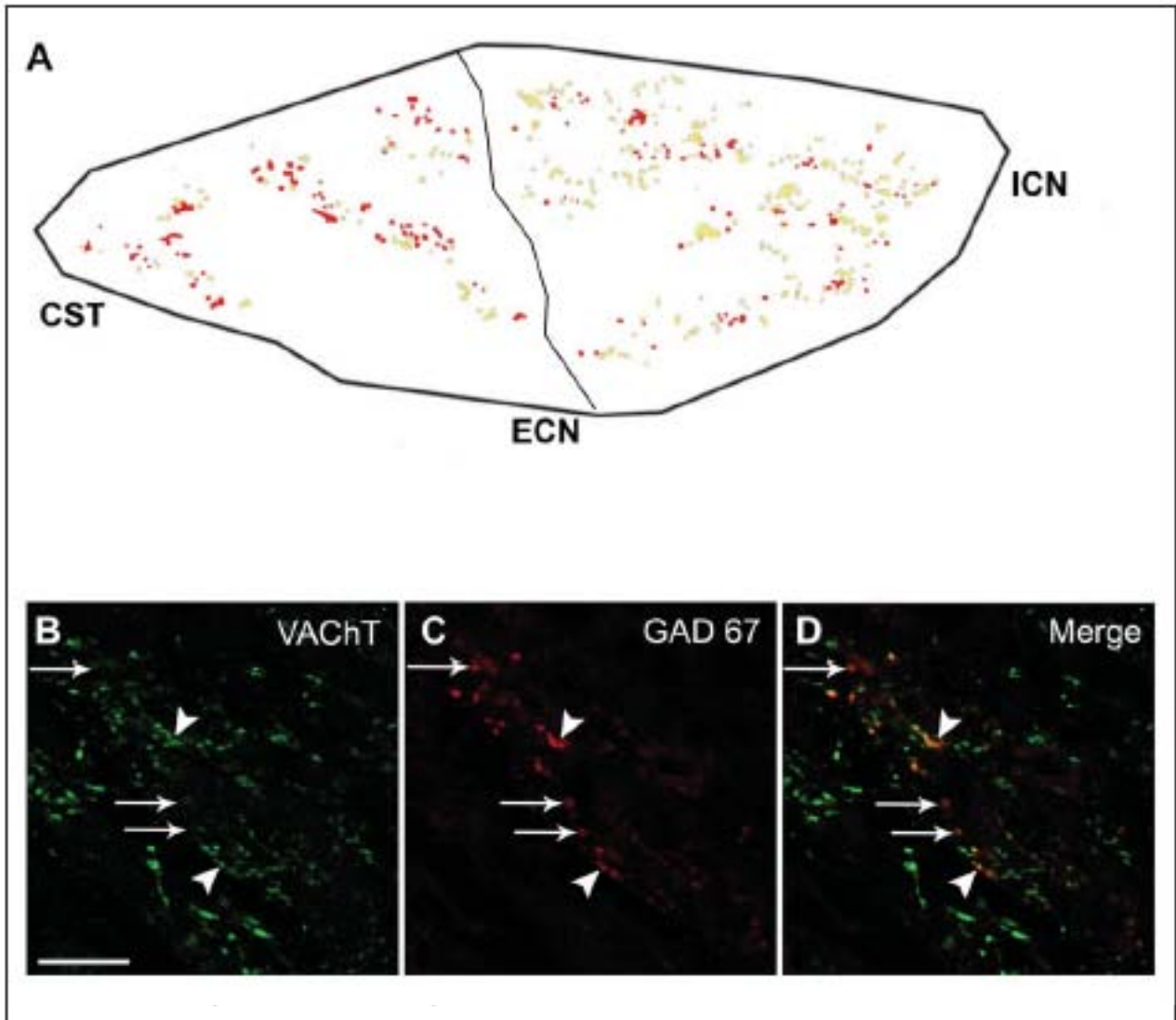


Figura 11. VACHT es segregado de las varicosidades que contienen GAD67. A: Esquema que representa la regionalización de la segregación entre VACHT y GABA; en amarillo se muestra la coexistencia entre VACHT y GAD67 y en rojo las varicosidades que son únicamente positivas a GAD67, se observa mayor segregación en la zona caudal. B-D: Secciones del GCS inmunomarcadas para VACHT (verde) y GAD67 (rojo). Se muestra la coexistencia en amarillo (cabezas de flecha) y la segregación entre los transmisores con las flechas. La barra representa 20 μ m.

9. 4. Las varicosidades que son inmunopositivas a GAD 67 no contienen al neuropéptido mENK, otro cotransmisor ganglionar inhibitorio.

Debido al conocido papel inhibitorio del GABA en la transmisión ganglionar, pensamos que los botones GABAérgicos que carecían de VAcHT podrían coalmacenar mENK, cotransmisor que modula negativamente la transmisión sináptica ganglionar (Zhang et al., 1995). Para investigar esta posibilidad realizamos dobles inmunomarcajes para GAD 67 y mENK. Sin embargo, no observamos coexistencia entre ellos ya que al realizar el análisis encontramos $93 \pm 4 \%$ de segregación (Figura 12A, B). Estos resultados sugieren que las NPS tienen distintos mecanismos y utilizan distintos neurotransmisores que producen inhibición en la transmisión ganglionar. Sin embargo, una observación importante es que las varicosidades de ambas moléculas inhibitorias se encuentran cercanas.

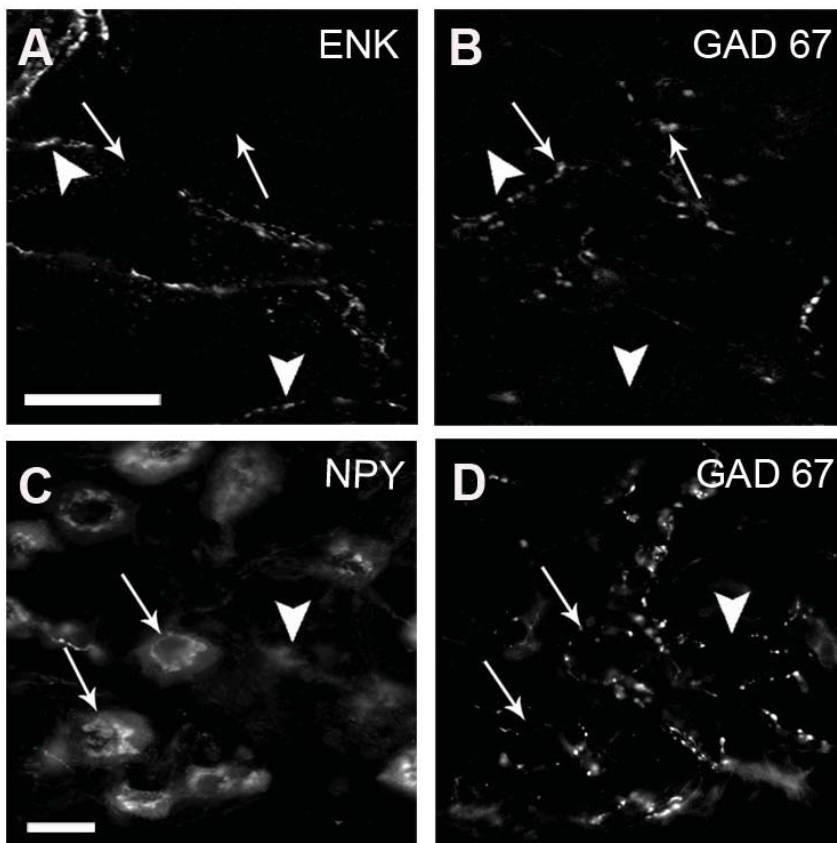


Figura 12. GAD 67 y el neuropéptido inhibitorio mENK se almacenan en diferentes botones sinápticos. La mayoría de las neuronas DCG son inmunopositivas a NPY. **A-B:** Secciones del GCS inmunomarcadas para mEnk (cabezas de flecha) y GAD 67 (flechas). **C-D:** Secciones del GCS inmunomarcadas para NPY (**C**) y GAD 67 (**D**). La barra representa 20 μm .

9.5 Las neuronas densamente contactadas por GABA (DCG) se localizan de manera preferencial en la region rostral y envían sus proyecciones principalmente por el NCI.

Con la finalidad de explorar el papel del GABA en la transmisión ganglionar, caracterizamos a las neuronas DCG. Al igual que el grupo de Wolff et al., analizamos la regionalización de estas neuronas, y observamos que 58% de las neuronas DCG se encuentran en la zona rostral del ganglio mientras que el 42 % se localiza en la zona caudal (Figura 13). Por otro lado, para determinar cuáles son las principales salidas de estas neuronas se utilizaron marcadores retrógrados para identificarlas (los marcadores se colocaron en el NCI y en el NCE). Igual que en estudios previos, confirmamos que las neuronas ganglionares ubicadas en la zona rostral envían sus axones principalmente por el NCI, mientras que las neuronas de la zona caudal envían sus axones principalmente por el NCE (Figura 13B). Encontramos que $67 \pm 2\%$ de las neuronas DCG rostrales envían sus axones por el NCI. Asimismo encontramos que $63 \pm 6\%$ de estas neuronas son positivas al cotransmisor ganglionar, NPY (Figura 12C, D). Estos resultados muestran que las neuronas DCG se encuentran localizadas principalmente en la zona rostral y son positivas a NPY; de acuerdo a éstas características pudieran corresponder a neuronas vasomotoras (Li & Horn, 2006).

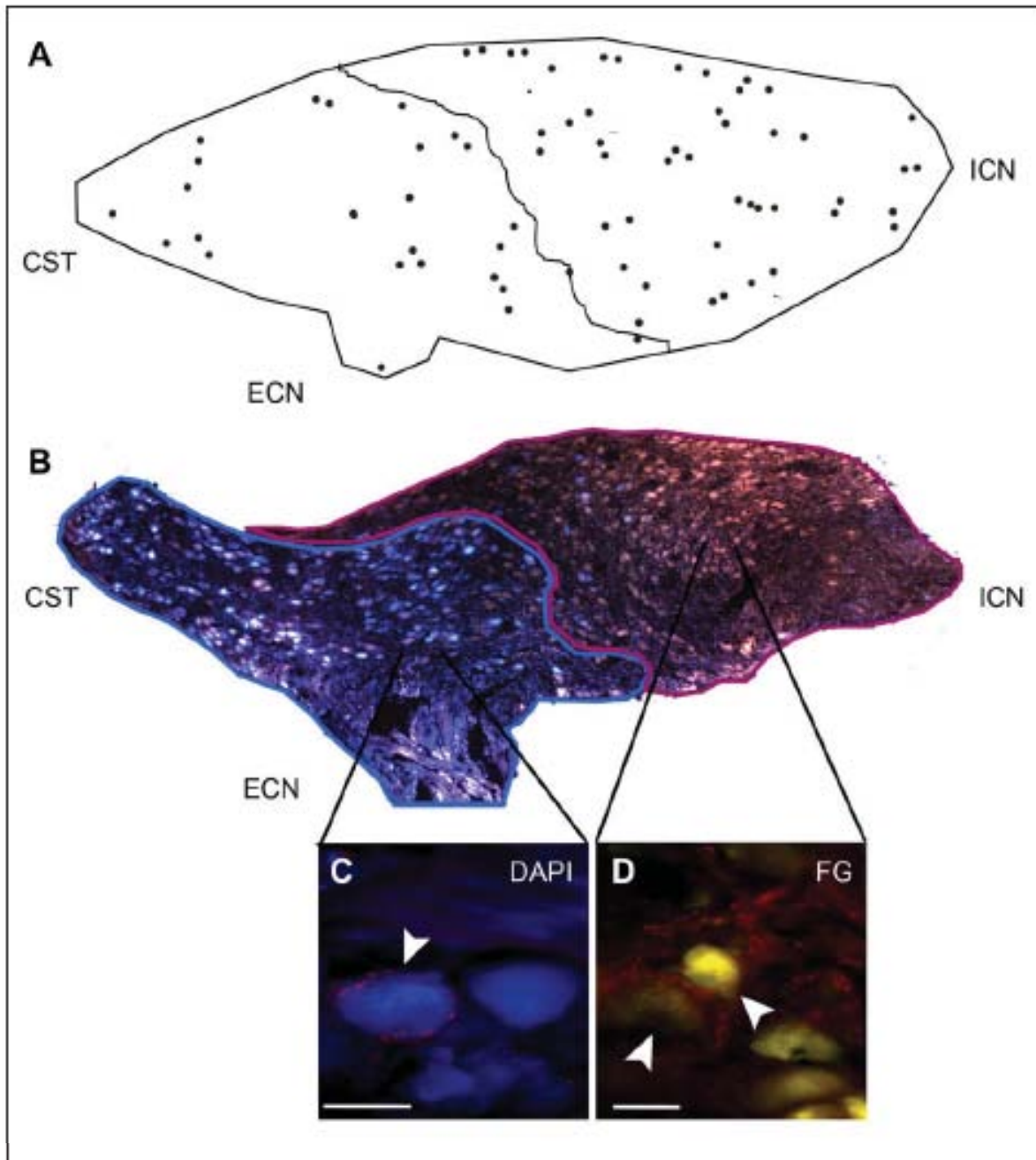


Figura 13. Las neuronas que se encuentran en la zona rostral y caudal envían sus proyecciones por el NCI y por el NCE (respectivamente). **A:** Las neuronas DCG se encuentran mayormente en la zona rostral del GCS. **B:** Reconstrucción de GCS marcado retrógradamente con FLUOROGOLD por el NCI (amarillo) y con DAPI en el NCE (azul). **C-D:** Neuronas marcadas retrógradamente con DAPI (**C**), FLUOROGOLD (**D**) rodeadas por varicosidades inmunomarcadas para GAD 67 (rojo). La escala representa 20 μ m.

9.6 Probable papel funcional de la distribución de GAD67 y de la la segregación entre GAD67-VACHT.

Para determinar si existe correlación entre la distribución regional de GABA y la segregación de neurotransmisores clásicos con la actividad sináptica ganglionar, realizamos registros de curvas I/O de los potenciales de acción compuesto (PACs), en el NCI y el NCE, esto con la finalidad de evaluar la transmisión ganglionar de las neuronas rostrales y caudales, respectivamente. Estas curvas reflejan el número de fibras que en cada nervio postganglionar son activadas a diferentes intensidades de estimulación ; la curva se desplaza cuando la fuerza de transmisión sináptica cambia (Johnston & Wu, 1995). Se puede observar claramente en la figura 14A que las neuronas que envían sus axones por el NCE son activadas a voltajes más bajos que aquellas que envían sus axones por el NCI. Por ello, en valores de entrada de 1V, la respuesta del NCE fue 0.5 ± 0.1 mV, mientras que en el NCI se observa una respuesta menor, p.e., $0.08 \pm .01$ mV ($P = 0.004$). Estos resultados muestran que la actividad sináptica ganglionar a través de las neuronas caudales, responde inicialmente y es mayor en comparación con la de las neuronas localizadas en la zona rostral. De acuerdo con las diferencias observadas en la transmisión ganglionar, de ambas poblaciones neuronales, era de esperarse que la administración de GABA exógeno produjera mayor inhibición en el NCI que en el NCE. Los resultados, en efecto mostraron mayor inhibición GABAérgica en el NCI que en el NCE, así 800 μ M de GABA causaron 61.5 ± 4.6 y $81.3 \pm 4.5\%$ de inhibición en la transmisión del NCE y del NCI, respectivamente (Figura 14B; $P = 0.017$).

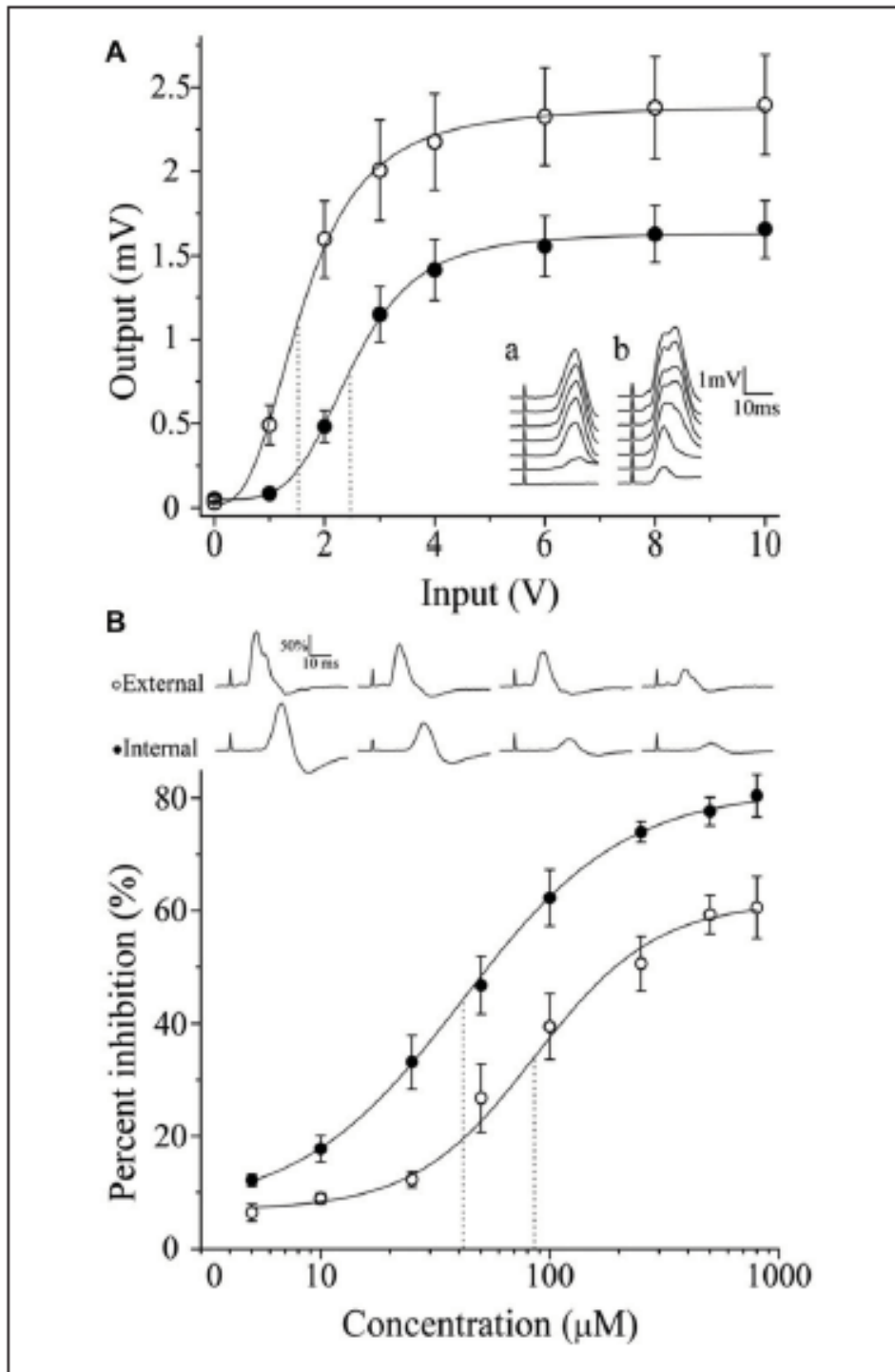


Figura 14. Regionalización de la transmisión sináptica y de la sensibilidad a GABA en el GCS. De acuerdo con su localización, las neuronas muestran diferentes niveles de activación y respuesta al GABA exógeno. **A**: Curva de entrada/salida de la transmisión ganglionar registrada en el NCE (círculos vacíos) y en el NCI (círculos llenos). Estímulos de amplitudes similares inducen respuestas mayores en el NCE que en el NCI. Los recuadros muestran un conjunto de potenciales de acción compuestos generados por cada estímulo probado, registrados en el NCI (a) en el NCE (b). **B**: Curvas dosis-respuesta del efecto del GABA exógeno en la transmisión ganglionar. Concentraciones similares de GABA producen mayor inhibición de PACs registrados en el NCI. Los valores del IC50 fueron 41.4 ± 5.5 y 86.3 ± 21.1 μM para el NCI y el NCE ($P = 0.017$). Se muestran las secuencias de los PACs con diferentes niveles de inhibición por GABA.

9.7 Correlación funcional de las diferencias regionales en los tipos de R GABA_A.

Considerando estudios en el sistema nervioso central, en los que se ha reportado que diferentes tipos de R GABA_A, sinápticos y extrasinápticos, se asocian con dos modelos de inhibición por GABA (Farrant & Nusser, 2005; Lee and Maguire, 2014), es válido teorizar que las diferencias regionales en la eficiencia de la transmisión ganglionar podrían correlacionarse con diferentes tipos de R GABA_A. Para explorar esta posible correlación comparamos: la velocidad de desensibilización de los R GABA_A al GABA exógeno (250 μM); el efecto antagónico de la PTX en la inhibición inducida por GABA; y el efecto de la PTX en la potenciación submáxima en regiones rostrales vs caudales.

Encontramos diferentes velocidades de desensibilización al GABA exógeno en el NCE y en el NCI, (NCE: 16.1 ± 3.1 min; NCI: 2.3 ± 0.8 min; P < 0.001). Respecto al efecto de la PTX en la inhibición de GABA, observamos una diferencia significativa en la respuesta obtenida en el NCE y el NCI, encontramos que mientras 20 μM de PTX genera un bloqueo de 61.2 ± 5.0 % de la inhibición de GABA en el NCE, en el NCI fue de 80.8 ± 4.4 % (P = 0.01; Figura 15A).

En la evaluación del efecto de PTX sobre la potenciación submáxima encontramos que igual que Gonzalez-Burgos et al., (1997), la aplicación de un tren de alta frecuencia con amplitud submaxima induce una potenciación pequeña en la región rostral, que dura menos de 30 min (área bajo la curva = 3.9 ± 1.1 u.a.), y que 50 μM de PTX aumenta de manera significativa esta respuesta convirtiéndola en una potenciación a largo plazo que dura 60 minutos aproximadamente (LTP; área bajo la curva = 25.7 ± 6.9 u.a ; P < 0.01). En la región caudal en cambio esta misma concentración de PTX no aumenta la mínima potenciación inducida por el tren submáximo (sin PTX: área = 3.8 ± 1.2 con PTX: área = 3.2 ± 1.4 u.a.; Figura 15B). Estas diferencias regionales en la sensibilidad a GABA y PTX, tanto en la transmisión basal como en la plasticidad sináptica, sugieren la presencia de diferentes tipos de

receptores GABA_A en las neuronas ganglionares rostrales y caudales. Es probable que los receptores extrasinápticos predominan en la región rostral.

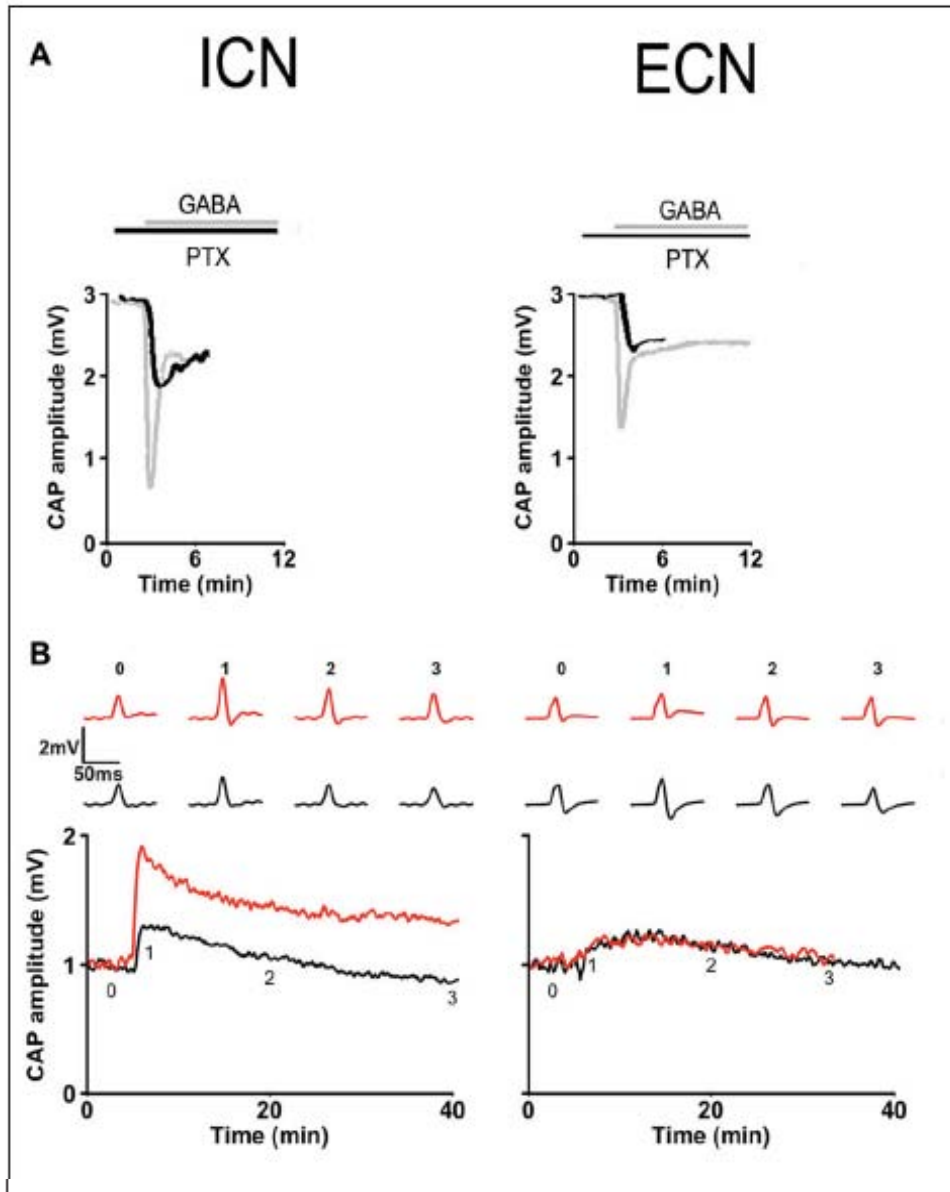


Figura 15. Diferencias sinápticas regionales en las respuestas al receptor GABA_A, en la transmisión basal y en la plasticidad. **A:** Transmisión basal. Curso temporal de las amplitudes de los PACs en respuesta a 250 μM de GABA registrados en presencia de 20 μM de picrotoxina (PTX) en el NCI (izq.) y NCE (der.). Se distingue que la PTX (trazo negro) antagoniza en mayor grado la inhibición de GABA en el NCI ($80.8 \pm 4.4 \%$) que en el NCE ($61.2 \pm 5.0 \%$). Los trazos grises muestran la inhibición de GABA registrada en ausencia de PTX. **B:** Plasticidad. Curso temporal de la potenciación producida por estimulación submáxima, 20 Hz, 20 s, registrado en el NCI (izq.) y NCE (der.). En condiciones control (negro) y en presencia de 50 μM de PTX (rojo). La PTX produce LTP en el NCI pero no en el NCE.

10. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demuestra que las NPS colinérgicas-GABAérgicas segregan *in vivo* sus transmisores ACh y GABA a varicosidades separadas. Encontramos que la inmunoreactividad al GAD 67 de las varicosidades preganglionares y al R GABAA $\alpha 4$ del cuerpo celular de las neuronas ganglionares sigue un gradiente rostro-caudal, en tanto el nivel de segregación de ACh y GABA muestra un gradiente caudo-rostral. Esta distribución heterogénea de la innervación GABAérgica, del R $\alpha 4$ GABAA y del nivel de segregación se correlaciona con diferencias regionales en la potencia de la transmisión y en el efecto inhibitorio de GABA. Así, en la región caudal, donde hay menor cantidad de GABA, menos receptores y mayor segregación, la transmisión sináptica es mas potente que en la región rostral. Además el GABA exógeno y el antagonista GABAérgico, la PTX, demuestran mayor inhibición y antagonismo sobre las neuronas rostrales que sobre las caudales.

Nuestro grupo ha aportado evidencias de segregación entre el neurotransmisor clásico (ACh) y diversos péptidos co-transmisores en las NPS (Sámamo et al., 2006; 2009). Así mismo hemos demostrado también la segregación entre neurotransmisores clásicos (ACh y noradrenalina) en cultivos de neuronas ganglionares y miocitos cardíacos (Vega et al., 2010). En este trabajo presentamos por vez primera evidencias de la segregación *in vivo* de dos transmisores simpáticos la ACh y el GABA en el ganglio simpático intacto. Nuestros datos indican que igual que en el SNC (Hattori et al, 1991, Sulzer y Rayport, 2000; Nishimaru et al., 2005; Kawano et al, 2006; Dal Bo et al 2008; Shutoh et al, 2008; Amilhon et al, 2010; Kudo et al, 2012; Zhang et al, 2015; Voisin et al, 2016) las neuronas simpáticas tienen la capacidad de enviar separadamente sus transmisores clásicos hacia distintas varicosidades de un mismo axón. Previo a nuestro estudio, Ito y colaboradores en el 2007 analizaron la presencia de GABA en el GCS, y en sus estudios de doble inmunofluorescencia simultánea de ACh y

GABA en el GCS reportaron, contrario a nuestros resultados, co-localización de estos transmisores en todos los botones sinápticos. Sin embargo en la figura correspondiente a este resultado (Figura 4 del trabajo de Ito et al, 2007), se puede observar que algunas varicosidades que expresan GAD67 carecen de VAcHT, sugiriendo entonces la presencia de algún grado de segregación entre VAcHT y GAD67.

Entonces, pensando en la segregación como una propiedad intrínseca de las neuronas, surgen algunas preguntas de ¿Cuál sería la ventaja de las neuronas de segregar sus transmisores? Se ha propuesto que la segregación aumenta las interacciones sinápticas y permite a las neuronas modificar de manera específica las funciones en una sola terminal durante experiencias plásticas. (Sámano et al., 2012). En el caso particular de nuestro trabajo proponemos que la segregación entre GABA y ACh en las NPS, este relacionada con la potencia de la transmisión ganglionar. Sugerimos esto debido a que en la zona rostral donde se encontró menos segregación existirían más botones con co-existencia de GABA y ACh lo que facilitaría la co-liberación y por lo tanto la inhibición GABAérgica de la actividad colinérgica. Por otro lado en la zona caudal la prevalencia de la segregación implicaría la existencia de más botones con solo GABA, que al liberarse independientemente de ACh podría generar menor inhibición de la acción colinérgica. Algo semejante ha sido reportado por Lee y colaboradores, quienes encontraron que las células amacrinas de la retina, que procesan independientemente diferentes señales visuales con ACh o con GABA, almacena estos neurotransmisores clásicos en poblaciones vesiculares de varicosidades separadas y dependiendo **del tipo de estimulación liberan** a uno u otro neurotransmisor (Lee et al., 2010).

Por otro lado, al analizar la presencia de GABA en el GCS observamos similitud entre nuestros resultados y aquellos encontrados por el grupo de Wolff y cols (1989; 1993) en años anteriores. Hemos confirmado la presencia de GABA tanto en los somas como en las varicosidades de las NPS (Ito et al., 2007). Además, corroboramos la presencia mayormente rostral de la innervación GABAérgica, resultados observados por Wolf (1989), y confirmamos la existencia de una población de neuronas que se encuentran densamente innervadas por GABA, misma que Wolff denominó como “RIG neurons”, nosotros las nombramos neuronas DCG (neuronas densamente contactadas por GABA). Las neuronas DCG mostraron ser neuronas de gran tamaño, en su mayoría positivas a NPY (neuropéptido vasomotor) y enviar sus axones por el NCI. Tomando en cuenta éstas características, pudieran corresponder a neuronas vasomotoras (Gibbins, 1991; Li & Horn, 2006). Aunado a éstas características, observamos independencia entre la innervación GABAérgica y encefalinérgica (modulador inhibitorio) que reciben las neuronas DCG, esto nos podría sugerir mecanismos moduladores inhibitorios diferenciales sobre la misma neurona (Elinos et al., 2016).

Además de confirmar la presencia de varicosidades preganglionares positivas a GAD 67, detectamos la inmunexpresión del receptor a GABA tipo A, subunidad $\alpha 4$ principalmente en los cuerpos celulares de las neuronas ganglionares principales y en algunos procesos neuronales que no correspondieron a fibras o varicosidades preganglionares. Nuestros resultados contrastan con lo comunicado por Amenta et al (1992) quienes detectaron el pegado del agonista GABAérgico radioactivo ^3H -muscimol preferencialmente en el neuropilo del GCS de rata. De la misma manera con estudios farmacológicos se infirió la presencia de los R GABA tipo A y B (Farkas et al, 1986). Una posibilidad de estas discrepancias es que otras subunidades, diferentes a la $\alpha 4$ que nosotros detectamos, sean expresados en sitios presinápticos; otra explicación es que el nivel de expresión del R GABA tipo A, subunidad $\alpha 4$ presináptico se encuentre por debajo de nuestro nivel de detección. La

inmunoexpresión de las subunidades $\beta 2/3$ del receptor GABA-A fue demostrada por Park et al (2006). La presencia de RNA mensajero de al menos 12 subunidades del receptor GABA-A también se describió en el SCG de rata (Liu & Burt, 1999).

La distribución regional de varicosidades positivas a GAD 67, así como los diferentes niveles regionales de segregación de ACh y GABA y del receptor a GABA nos llevó a considerar la posibilidad de que en cada región se manifestara un nivel diferente de inhibición GABAérgica. Encontramos, en efecto, que la mayor presencia de GABA y sus receptores junto con menor segregación en la región rostral coinciden con una transmisión menos eficiente y mayor inhibición por GABA exógeno. Por lo contrario, en la región caudal con menor cantidad de GABA, menor cantidad de receptores y mayor segregación se encontró una transmisión más potente y una menor inhibición por GABA exógeno. En línea con estos resultados Li & Horn (2006) encontraron que las neuronas de bajo umbral (mas excitables) tienen más presencia en la región caudal que en la rostral.

Un aspecto importante de ser considerado es el posible papel funcional de estas diferencias regionales en la segregación de ACh y GABA. Ambos son NTS clásicos de acción rápida que se almacenan en vesículas claras pequeñas (scv); ACh es el transmisor principal de las sinapsis ganglionares, mientras que GABA inhibe la transmisión. Se ha encontrado que la inhibición GABAérgica dependiendo de la localización de sus receptores puede ser de dos tipos: si los receptores están localizados en la zona sináptica inducen una inhibición transitoria breve o fásica(cuanto), mientras que si están situados extrasinápticamente producen inhibición mas amplia y duradera identificada como tónica (Farrant & Nusser, 2005). En la región rostral donde encontramos menos segregación es de esperarse que ACh y GABA sean mayoritariamente co-almacenados en las mismas varicosidades y por lo tanto puedan ser liberados las mayoría de veces juntos.

Este co-almacenamiento y coliberación de ACh y GABA, junto con mayor presencia de GABA y sus receptores en la región rostral pudiera resultar en una más eficiente y potente inhibición GABAérgica de la transmisión ganglionar.

Pudiera entonces esperarse que la región rostral albergara a los receptores GABAérgicos extrasinápticos de alta afinidad responsables de la potente inhibición tónica sostenida, encontrada en esta región. En contraparte, en la región caudal donde encontramos la mayor segregación y menor presencia de GABA y sus receptores, se esperaría un almacenamiento independiente de GABA y ACh acompañado de una liberación independiente y de menor cuantía de GABA con prevalencia de receptores sinápticos que daría lugar a menor inhibición o incluso a otro tipo de efectos de GABA. Esta reducida inhibición podría también ser favorecida por una presencia mayoritaria de receptores sinápticos de baja afinidad en esta región. Coincidentemente, en regiones del SNC como hipocampo, corteza y cerebelo, Farrant & Nusser (2006) han descrito que el GABA produce inhibición tanto fásica como tónica.

Para probar nuestra hipótesis de que las neuronas rostrales expresan preferentemente receptores GABAérgicos extrasinápticos, investigamos características patonogónicas de los dos tipos de receptores, sinápticos y extrasinápticos, como la velocidad de desensibilización y la sensibilidad a GABA y sus antagonistas como la PTX. Encontramos que las neuronas rostrales registradas a través del NCI exhiben mayor sensibilidad a GABA y a PTX, de tal manera que este antagonista GABAérgico bloquea más el efecto inhibitorio de GABA en la transmisión basal, además de que devela una LTP inducida con estimulación submáxima. De acuerdo a la conocida mayor afinidad de los receptores GABA-A extrasinápticos (Semyanov et al., 2003; Farrant and Nusser, 2005; Lee & Maguire, 2014), nuestros resultados electrofisiológicos y farmacológicos refuerzan nuestra propuesta de que las neuronas rostrales contienen una mayor proporción de receptores GABA extrasinápticos.

Inesperadamente, también encontramos una desensibilización más rápida en las neuronas rostrales.

Se sabe que las neuronas rostrales están relacionadas con la modulación de la actividad del ojo, la vasculatura del cerebro y de la parte superior de la cabeza así como de la glándula pineal, entonces creemos que la modulación a estos órganos podría requerir mayor inhibición GABAérgica; por otro lado las neuronas caudales que inervan la vasculatura de la boca y la región maxilar así como las glándulas salivales y la tiroides podrían requerir menos inhibición GABAérgica para lograr la regulación de estos blancos. Incluso existiría la posibilidad que el GABA en la región caudal tenga funciones diferentes al de la modulación inhibitoria.

A manera de conclusión, durante varios años se ha pensado que el Sistema Nervioso Simpático no tiene una modulación específica ni fina, sin embargo con nuestros hallazgos, la demostración de la segregación entre ACh y GABA, su distribución diferencial y el papel de la segregación en la transmisión ganglionar hemos evidenciado que no es así. Los ganglios simpáticos son sitios de relevo de información, en los cuales la modulación sináptica podría ser tan compleja que la segregación de neurotransmisores sería una manera por medio de la cual las neuronas asegurarían más opciones de generación de respuestas, lo que puede resultar en una regulación diferencial y específica de las actividades de sus órganos blanco.

11. CONCLUSIONES

1. Confirmamos la presencia de innervación GABAérgica en las neuronas ganglionares, demostramos también que esa innervación proviene de las NPS y que coexisten con marcadores sinápticos, lo cual indica que corresponden a varicosidades preganglionares.
2. Observamos que existen dos tipos de fibras GABAérgicas, unas que rodean a las neuronas ganglionares y otras que únicamente pasan de manera tangencial a los cuerpos celulares. Confirmamos el gradiente rostro-caudal de la innervación GABAérgica ganglionar.
3. Descubrimos que la expresión del receptor $\alpha 4$ GABA_A expresa también el gradiente rostro-caudal de la innervación GABAérgica.
4. **Demostremos que *in vivo* las NPS, segregan sus NTs clásicos (GABA y ACh) a distintas varicosidades. Cuantificamos la segregación de manera regional y observamos que a diferencia del GABA y su receptor muestra un gradiente caudo-rostral.**
5. Demostremos que los botones positivos a GABA no son positivos a otro modulador inhibitorio como la mENK, lo cual sugiere que las inhibiciones ocurren por mecanismos diferentes
6. Revelamos diferencias de sensibilidad del receptor GABA_A al GABA y a PTX, así como un efecto regional de la PTX en develar una LTP submáxima. Con estos datos sugerimos que los receptores GABA_A $\alpha 4$ de las neuronas rostrales son mayoritariamente extrasinápticos, mientras que los de las caudales son sinápticos.
7. **Finalmente reportamos una correlación funcional de la distribución regional de GABA, su receptor y la segregación de ACh y GABA. En la región rostral donde hay más GABA, más receptores y menos segregación la transmisión es menos potente y la**

inhibición GABAérgica es más fuerte. Por el contrario en la región caudal que muestra menos GABA, menos receptores y más segregación la transmisión es más potente con menor inhibición GABAérgica. Propusimos que esta modulación GABAérgica regionalizada, pudiera estar relacionada con diferentes niveles de la modulación ganglionar sobre los órganos blanco inervados.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Adams PR, B. D. (1975). Actions of gamma-aminobutyric acid on sympathetic ganglion cells. *J Physiol.* 250(1), 85–120.
- Amenta, F., Bronzetti, E., Cavallotti, C., Felici, L., Ferrante, F., & Collier, W. L. (1992). Autoradiographic localization of the gamma-aminobutyric acid type A receptor agonist 3H-muscimol in the rat superior cervical ganglion. *Pharmacology*, 44(2), 107–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1315061>
- Ballanyi K, Grafe P, Reddy MM, ten B. G. (1984). Different types of potassium transport linked to carbachol and gamma-aminobutyric acid actions in rat sympathetic neurons. *Neuroscience.*, 12(3), 917–27.
- Bertilsson L, Suria A, C. E. (1976). gamma-aminobutyric acid in rat superior cervical ganglion. *Nature.*, 260(5551), 540–1.
- Bito, H. (2010). The chemical biology of synapses and neuronal circuits. *Nature Publishing Group*, 6(8), 560–563. <http://doi.org/10.1038/nchembio.408>
- Blitz, D. M., Swensen, A. M., Wood, D., & Marder, E. (2001). The roles of co-transmission in neural, 24(3), 146–154.
- Boarder MR1. (1989). Presynaptic aspects of cotransmission: relationship between vesicles and neurotransmitters. *J Neurochem.*, 53(1), 1–11.
- Bowery, N. G., & Enna, S. J. (2000). gamma-aminobutyric acid(B) receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292(1), 2–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10604925>

- Burke, R. E. (2006). John Eccles ' pioneering role in understanding central synaptic transmission, 78, 173–188. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.02.002>
- Burnstock, G. (2013). *Cotransmission in the autonomic nervous system. Autonomic Nervous System* (1st ed., Vol. 117). Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-53491-0.00003-1>
- Burnstock, G. (2004). Cotransmission, 47–52. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2003.08.001>
- Burnstock, G. (1976). Commentary do Some Nerve Cells Release one Transmitter? *THAN*, 1 (1968), 239–248.
- Campbell G. (1987). Cotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* , 27, 51–70.
- Curtis, D. R., Hösl, L., Johnston, G. A., & Johnston, I. H. (1968). The hyperpolarization of spinal motoneurons by glycine and related amino acids. *Experimental Brain Research*, 5(3), 235–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5721753>
- Dal Bo, G., Mendez, J. A., Berube-Carriere, N., Leo, D., Riad, M., Descarries, L., ... Trudeau, L. (2008). Enhanced Glutamatergic Phenotype of Mesencephalic dopamine neurons after neonatal 6-hydroxydopamine lesion., 156, 59–70. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.07.032>
- De Groat, W. C. (1970). The actions of gamma-aminobutyric acid and related amino acids on mammalian autonomic ganglia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 172(2), 384–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4315005>
- El Mestikawy, S., Wallén-Mackenzie, A., Fortin, G. M., Descarries, L., & Trudeau, L.-E. (2011). From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nature Reviews. Neuroscience*, 12(4), 204–16. <http://doi.org/10.1038/nrn2969>

- Elinos, D., Rodríguez, R., Martínez, L. A., Zetina, M. E., Cifuentes, F., & Morales, M. A. (2016). Segregation of Acetylcholine and GABA in the Rat Superior Cervical Ganglia: Functional Correlation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *10*, 91. <http://doi.org/10.3389/fncel.2016.00091>
- Evans, C. G., Ludwar, B. C., Kang, T., Cropper, E. C., Evans, C. G., Ludwar, B. C., ... Cropper, E. C. (2015). Effect of presynaptic membrane potential on electrical vs chemical synaptic transmission. *Effect of presynaptic membrane potential on electrical vs chemical synaptic transmission*, (May 2011), 680–689. <http://doi.org/10.1152/jn.00340.2011>
- Farkas Z1, Kása P, Balcar VJ, Joó F, W. J. (1986). Type A and B gaba receptors mediate inhibition of acetylcholine release from cholinergic nerve terminals in the superior cervical ganglion of rat. *Neurochem Int.*, *8*(4), 565–72.
- Farrant, M., & Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nature Reviews. Neuroscience*, *6*(3), 215–29. <http://doi.org/10.1038/nrn1625>
- 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. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *34*(1), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.09.005>
- Gagnon, D., & Parent, M. (2014). Distribution of VGLUT3 in Highly Collateralized Axons from the Rat Dorsal Raphe Nucleus as Revealed by Single-Neuron Reconstructions. *PLoS ONE*, *9*(2), e87709. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0087709>
- González Burgos GR1, Biali FI, C. D. (1997). Picrotoxin-sensitive receptors mediate gamma-aminobutyric acid-induced modulation of synaptic plasticity in rat superior cervical ganglion. *Brain Res.*, *751*(1), 148–51.

- González Burgos GR1, Biali FI, Nicola Siri LC, C. D. (1994). Effect of gamma-aminobutyric acid on synaptic transmission and long-term potentiation in rat superior cervical ganglion. *Brain Res.*, 658(1-2), 1.7.
- Gundersen, V. (2008). Co-localization of excitatory and inhibitory transmitters in the brain, *117*(18), 29–33.
- Gutiérrez, R. (2005). The dual glutamatergic-GABAergic phenotype of hippocampal granule cells. *Trends in Neurosciences*, 28(6), 297–303. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2005.04.005>
- Hattori, T., Takada, M., Moriizumi, T., & Van der Kooy, D. (1991). Single dopaminergic nigrostriatal neurons form two chemically distinct synaptic types: possible transmitter segregation within neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 309(3), 391–401. <http://doi.org/10.1002/cne.903090308>
- Herzog, E., Landry, M., Buhler, E., Legay, C., Henderson, C. E., Nagy, F., ... Mestikawy, S. El. (2004). Expression of vesicular glutamate transporters , VGLUT1 and VGLUT2 , in cholinergic spinal motoneurons, *20*(July), 1752–1760. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03628.x>
- Hokfelt, T. (1991). Neuropeptides in Perspective : The Last Ten Years, *7*, 867–879.
- Ito T1, Iino S, N. Y. (2005). A part of cholinergic fibers in mouse superior cervical ganglia contain GABA or glutamate. *Brain Res*, 1046(1-2), 234–8.
- Ito, T., Hioki, H., Nakamura, K., Tanaka, Y., Nakade, H., Kaneko, T., ... Nojyo, Y. (2007). γ -Aminobutyric acid-containing sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord send their axons to the superior cervical ganglion. *The Journal of Comparative Neurology*, 502(1), 113–125. <http://doi.org/10.1002/cne.21309>

- Iverfeldt, K., Serfözö, P., Arnesto, L. D., & Bartfai, T. (1989). Differential release of coexisting neurotransmitters: frequency dependence of the efflux of substance P, thyrotropin releasing hormone and [³H]serotonin from tissue slices of rat ventral spinal cord. *Acta Physiologica Scandinavica*, 137(1), 63–71. <http://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1989.tb08721.x>
- Jiménez, B., Mora-Valladares, E., Zetina, M. E., & Morales, M. A. (2002). Occurrence, co-occurrence and topographic distribution of choline acetyl transferase, Met-enkephalin and neurotensin in the stellate ganglion of the cat. *Synapse (New York, N.Y.)*, 43(3), 163–74. <http://doi.org/10.1002/syn.10030>
- Johnston, D., and Wu, S. (1995). *Foundations of Cellular Neurophysiology*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Jonas, P., Bischofberger, J., & Sandkühler, J. (1998). Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5375), 419–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665886>
- Johnston, G. A. (1996). GABA_A receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends in Pharmacological Sciences*, 17(9), 319–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8885697>
- Kása P1, Joó F, Dobó E, Wenthold RJ, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, W. J. (1988). Heterogeneous distribution of GABA-immunoreactive nerve fibers and axon terminals in the superior cervical ganglion of adult rat. *Neuroscience*, 26(2), 635–44.
- Kawano, M., Kawasaki, A., & Sakata-haga, H. (2006). Particular Subpopulations of Midbrain and Hypothalamic Dopamine Neurons Express Vesicular Glutamate Transporter 2 in the Rat Brain, 592(August 2005), 581–592. <http://doi.org/10.1002/cne>

- Kawatani, M., Rutigliano, M., & de Groat, W. C. (1985). Depolarization and muscarinic excitation induced in a sympathetic ganglion by vasoactive intestinal polypeptide. *Science (New York, N.Y.)*, 229(4716), 879–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3895438>
- Koelle, G. B. (1957). The localization of acetylcholinesterase in neurons. *Progress in Neurobiology*, 2, 164–70; discussion 170–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13477749>
- Landis, S. C. (1976). Rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures: correlation of the fine structure of endings with neurotransmitter function in single neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(11), 4220–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1069311>
- Landry, M., Vila-Porcile, E., Hökfelt, T., & Calas, A. (2003). Differential routing of coexisting neuropeptides in vasopressin neurons. *The European Journal of Neuroscience*, 17(11), 579–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814355>
- Lee, V., & Maguire, J. (2014). The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type. *Frontiers in Neural Circuits*, 8, 3. <http://doi.org/10.3389/fncir.2014.00003>
- Li, C., & Horn, J. P. (2006). Physiological classification of sympathetic neurons in the rat superior cervical ganglion. *Journal of Neurophysiology*, 95(1), 187–95. <http://doi.org/10.1152/jn.00779.2005>
- Lindh B1, H. T. (1990). Structural and functional aspects of acetylcholine peptide coexistence in the autonomic nervous system. *Prog Brain Res.*, 84, 175–91. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.06.010>
- Lisman, J. E., Raghavachari, S., & Tsien, R. W. (2007). The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses, (July). <http://doi.org/10.1038/nrn2191>

- Liu, Z. F., & Burt, D. R. (1999). GABAA receptor subunit mRNAs in rat superior cervical ganglia. *Pharmacology*, 58(1), 51–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9831831>
- Lee, S., Kim, K., & Zhou, Z. J. (2010). Article Role of ACh-GABA Cotransmission in Detecting Image Motion and Motion Direction. *Neuron*, 68(6), 1159–1172. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.031>
- Nishimaru, H., Restrepo, C. E., Ryge, J., Yanagawa, Y., & Kiehn, O. (2005). Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses, *102*(14), 5245–5249.
- Osborne, N. N. (1979). Is Dale ' s principle valid ?, (March), 73–75.
- Parducz A1, Joó F, Siklós L, W. J. (1990). Fine structural changes in the superior cervical ganglion of adult rats after long-term administration of baclofen, a GABAB receptor agonist. *Neuroscience*, 36(1), 239–45.
- Park, J. C., Song, D. Y., Lee, J. S., Kong, I. D., Jeong, S.-W., Lee, B. H., ... Cho, B. P. (2006). Expression of GABAA receptor beta2/3 subunits in the rat major pelvic ganglion. *Neuroscience Letters*, 403(1-2), 35–9. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.04.051>
- Pereda, A. E. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Publishing Group*, 15(4), 250–263. <http://doi.org/10.1038/nrn3708>
- Pitman RM. (1984). The versatile synapse. *J Exp Biol*, 112, 199–224.

Prado, M. A. M., Reis, R. A. M., Prado, V. F., Christina, M., Mello, D., Gomez, M. V, & Mello, F. G. De. (2002). Regulation of acetylcholine synthesis and storage, *41*, 291–299.

Purves, D. *Neuroscience*. [en línea], 3ra edición,: Sunderland MA, 2004.

Sabo, S. L., Gomes, R. A., & McAllister, A. K. (2006). Formation of presynaptic terminals at predefined sites along axons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(42), 10813–25. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2052-06.2006>

Salio, C., Lossi, L., & Ferrini, F. (2006). Neuropeptides as synaptic transmitters, 583–598. <http://doi.org/10.1007/s00441-006-0268-3>

Sámano, C., Zetina, M. E., Cifuentes, F., & Morales, M. A. (2009). Segregation of met-enkephalin from vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in sympathetic preganglionic varicosities mostly lacking synaptophysin and synaptotagmin. *Neuroscience*, *163*(1), 180–9. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.06.010>

Sámano, C., Zetina, M. E., Marín, M. A., Cifuentes, F., & Morales, M. A. (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 (New York, N.Y.)*, *60*(4), 295–306. <http://doi.org/10.1002/syn.20300>

Sámano, C., Cifuentes, F., & Morales, M. A. (2012). Neurotransmitter segregation: functional and plastic implications. *Progress in Neurobiology*, *97*(3), 277–87. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.04.004>

Schaffer, M. K., Defamie, N., Weihe, E., & Erickson, J. D. (2002). Molecular Cloning and Functional Identification of Mouse Vesicular Glutamate Transporter 3 and Its Expression in Subsets of Novel Excitatory Neurons *, *277*(52), 50734–50748. <http://doi.org/10.1074/jbc.M206738200>

- Seal, R. P., & Edwards, R. H. (2006). Functional implications of neurotransmitter co-release: glutamate and GABA share the load, 114–119. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2005.12.001>
- Semyanov, A., Walker, M. C., & Kullmann, D. M. (2003). GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nature Neuroscience*, 6(5), 484–90. <http://doi.org/10.1038/nm1043>
- Shida T1, Kondo E, Ueda Y, Takai N, Yoshida Y, Araki T, Kiyama H, T. M. (1995). Role of amino acids in salivation and the localization of their receptors in the rat salivary gland. *Brain Res Mol Brain Res.*, 33(2), 261–8.
- Smyth, L., Bobalova, J., Ward, S. M., Keef, K. D., & Mutafova-yambolieva, V. N. (2000). Cotransmission from sympathetic vasoconstrictor neurons: differences in guinea-pig mesenteric artery and vein, 86, 18–29.
- Sossin, W. S., Sweet-cordero, A., & Scheller, R. H. (1990). Dale ' s hypothesis revisited: Different neuropeptides derived from a common prohormone are targeted to different processes, 87(June), 4845–4848.
- Strata, P., & Harvey, R. (1999). Dale ' s principle, 50(99), 349–350.
- Sulzer, D., Joyce, M. P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S. N., Hattori, T., & Rayport, S. (1998). Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(12), 4588–602. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9614234>

Sulzer, D., & Rayport, S. (2000). Dale's principle and glutamate corelease from ventral midbrain dopamine neurons. *Amino Acids*, 19(1), 45–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11026472>

Südhof, T. C. (2008). Neurotransmitter release. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (184), 1–21. http://doi.org/10.1007/978-3-540-74805-2_1

Trudeau, L., Hnasko, T. S., Morales, M., Rayport, S., & Sulzer, D. (2014). The multilingual nature of dopamine neurons 6° , *211*, 141–164. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-63425-2.00006-4>

Tsen, G., Williams, B., Allaire, P., Zhou, Y., Ikonomov, O., Kondova, I., & Jacob, M. H. (2000). Receptors with opposing functions are in postsynaptic microdomains under one presynaptic terminal, *3*(2).

Vaaga, C. E., Borisovska, M., & Westbrook, G. L. (2014). Dual-transmitter neurons: functional implications of co-release and co-transmission. *Current Opinion in Neurobiology*, 29, 25–32. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2014.04.010>

Valenstein, E. S. (2002). The discovery of chemical neurotransmitters. *Brain and Cognition*, 49(1), 73–95. <http://doi.org/10.1006/brcg.2001.1487>

Vega, A., Luther, J. A., Birren, S. J., & Morales, M. A. (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. <http://doi.org/10.1002/dneu.20834>

Wolff JR, Joó F, D. W. (1978). Plasticity in dendrites shown by continuous GABA administration in superior cervical ganglion of adult rat. *Nature.*, 274(5666), 72–4.

- Wolff JR, Joó F, Kása P, Storm-Mathiesen J, Toldi J, B. V. (1986). Presence of neurons with GABA-like immunoreactivity in the superior cervical ganglion of the rat. *Neurosci Lett.*, 71(2), 157–62.
- Wolff JR1, Kása P, Dobó E, Römgens HJ, Párducz A, Joó F, W. A. (334AD). Distribution of GABA-immunoreactive nerve fibers and cells in the cervical and thoracic paravertebral sympathetic trunk of adult rat: evidence for an ascending feed-forward inhibition system. *1993*, 2(281-93).
- Wolff JR1, Kasa P, Dobo E, Wenthold RJ, J. F. (1989). Quantitative analysis of the number and distribution of neurons richly innervated by GABA-immunoreactive axons in the rat superior cervical ganglion. *J Comp Neurol.*, 282(2), 264–73.
- Zhang C1, Bachoo M, Morales M, Collier B, P. C. (1995). The site of the inhibitory action of endogenous opioids in the superior cervical ganglion of the cat. *Brain Res*, 683(1), 59–64.
- Zhang, S., Qi, J., Li, X., Wang, H.-L., Britt, J. P., Hoffman, A. F., ... Morales, M. (2015). Dopaminergic and glutamatergic microdomains in a subset of rodent mesoaccumbens axons. *Nature Neuroscience*, 18(3), 386–92. <http://doi.org/10.1038/nn.3945>

ANEXO 1.

Segregation of Acetylcholine and GABA in the rat superior cervical ganglia: functional correlation.



Segregation of Acetylcholine and GABA in the Rat Superior Cervical Ganglia: Functional Correlation

Diana Elinos, Raúl Rodríguez, Luis Andres Martínez, María Elena Zetina, Fredy Cifuentes and Miguel Angel Morales *

Departamento de Biología Celular and Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Sympathetic neurons have the capability to segregate their neurotransmitters (NTs) and co-transmitters to separate varicosities of single axons; furthermore, in culture, these neurons can even segregate classical transmitters. *In vivo* sympathetic neurons employ acetylcholine (ACh) and other classical NTs such as gamma aminobutyric acid (GABA). Herein, we explore whether these neurons *in vivo* segregate these classical NTs in the superior cervical ganglia of the rat. We determined the topographical distribution of GABAergic varicosities, somatic GABA_A receptor, as well as the regional distribution of the segregation of ACh and GABA. We evaluated possible regional differences in efficacy of ganglionic synaptic transmission, in the sensitivity of GABA_A receptor to GABA and to the competitive antagonist picrotoxin (PTX). We found that sympathetic preganglionic neurons *in vivo* do segregate ACh and GABA. GABAergic varicosities and GABA_A receptor expression showed a rostro-caudal gradient along ganglia; in contrast, segregation exhibited a caudo-rostral gradient. These uneven regional distributions in expression of GABA, GABA_A receptors, and level of segregation correlate with stronger synaptic transmission found in the caudal region. Accordingly, GABA_A receptors of rostral region showed larger sensitivity to GABA and PTX. These results suggest the presence of different types of GABA_A receptors in each region that result in a different regional levels of endogenous GABA inhibition. Finally, we discuss a possible correlation of these different levels of GABA modulation and the function of the target organs innervated by rostral and caudal ganglionic neurons.

Keywords: co-transmission, VAcHT, GAD67, SPN, GABA_AR

OPEN ACCESS

Edited by:

Arianna Maffei,
Stony Brook University, USA

Reviewed by:

Elsa Fabbretti,
University of Nova Gorica, Slovenia
Rodolfo Delgado-Lezama,
Center for Research and Advanced
Studies of the National Polytechnic
Institute (Cinvestav), Mexico

*Correspondence:

Miguel Angel Morales
mamm@biomedicas.unam.mx

Received: 02 October 2015

Accepted: 23 March 2016

Published: 07 April 2016

Citation:

Elinos D, Rodríguez R, Martínez LA,
Zetina ME, Cifuentes F and
Morales MA (2016) Segregation of
Acetylcholine and GABA in the Rat
Superior Cervical Ganglia:
Functional Correlation.
Front. Cell. Neurosci. 10:91.
doi: 10.3389/fncel.2016.00091

INTRODUCTION

Neurons use neurotransmitters (NTs) to convey their signals through chemical synapses. Most neurons operate with more than one NT, a characteristic known as cotransmission (Burnstock, 1976; Hökfelt et al., 1977). Originally, cotransmission was defined as the presence and release of one classical transmitter along with one or more cotransmitters. Later, it was reported that cotransmission could also involve the co-existence of two classical transmitters (see the book by Gutiérrez, 2009). Sympathetic ganglia were one of the first neuronal structures where the presence of the classical NTs, acetylcholine (ACh; Feldberg and Gaddum, 1934) and noradrenaline (NA; von Euler, 1946) was shown. Later, the presence of other NTs was described, like ATP (Burnstock, 1976),

various neuropeptides that neuromodulate cholinergic transmission (Hökfelt et al., 1977; Dun and Karczmar, 1979; Jan et al., 1979), as well as classical transmitters like glutamate and gamma aminobutyric acid (GABA; Wolff et al., 1986; Dobó et al., 1989; Senba et al., 1991; Ito et al., 2005, 2007). In contrast to the known modulatory function of cotransmitters, the presence of two classical NTs in sympathetic ganglia does not necessarily imply a dual phenotype (excitatory or inhibitory) ganglionic synapse, since it has been reported that GABA, besides its synaptic function, has metabolic and morphogenetic actions in the superior cervical ganglion (SCG) of the rat (Wolff et al., 1987).

Early on, it was assumed that to achieve cotransmission, neurons store and release the same set of NTs from all their processes (Chan-Palay and Palay, 1984; Burnstock, 1990; Merighi, 2002). However, evidence has shown that cotransmission can be achieved not only by the co-storage and co-release of the same combination of NTs from all neuronal synaptic endings, but also by the concurrent release of NTs previously segregated to separate synaptic boutons (Sossin et al., 1990; El Mestikawy et al., 2011; Sámano et al., 2012; Zhang et al., 2015). We and others have provided evidence that sympathetic neurons segregate ACh and diverse neuropeptides to separate varicosities (Morales et al., 1995; Chanthaphavong et al., 2003; Sámano et al., 2006, 2009, 2012). We have also shown that ciliary neurotrophic factor (CNTF) potentiates the segregation of ACh and NA to separate varicosities of sympathetic neurons cocultured with cardiac myocytes (Vega et al., 2010). Based on these findings, we have proposed that cotransmission in sympathetic synapses is achieved not only by the co-release of ACh and cotransmitters from the same bouton, but also by the concurrent release of NTs independently stored in separate presynaptic boutons (Sámano et al., 2009, 2012). Segregation represents a simpler and more direct mechanism to release distinct transmitters from single boutons. Additionally, segregation facilitates the ability of neurons to convey different information to distinct targets. The presence of two classical transmitters in sympathetic neurons, such as ACh and GABA, raises the question whether these neurons can segregate them. To explore the possibility of this segregation, in this work we analyzed the occurrence and co-occurrence of L-glutamic acid decarboxylase (GAD67, the enzyme responsible for the synthesis of GABA) and the cholinergic markers choline acetyl transferase (ChAT) or the vesicular ACh transporter (VAChT) in the soma and varicosities of sympathetic preganglionic neurons (SPN). Furthermore, we also investigated a possible role of segregation of ACh-GABA in determining GABAergic modulation of ganglionic function. We found that, in fact, sympathetic ACh-GABA dual phenotype neurons do segregate ACh and GABA to separate varicosities in the SCG of the rat. Furthermore, we demonstrated a possible role of segregation of ACh and GABA in establishing different levels of inhibitory regulation of sympathetic transmission.

MATERIALS AND METHODS

Experiments were carried out on male Wistar rats (200–250 g), which were treated in accordance with the ethical guidelines

for the care and use of laboratory animals of the National Academy of Sciences of the United States and approved by our Institutional Committee for the Care and Use of Animals in the Laboratory. For all surgical procedures, rats were anesthetized with xylazine (10 mg/kg i.m.) and ketamine (90 mg/kg i.p.).

Histological Procedures

To decentralize the ganglion, the sympathetic thoracic trunk (STT) was exposed and cut 3–5 mm caudal to the ganglion. After the surgical procedure, the animals were given postoperative care. To label SPN or ganglionic neurons, the Fluoro-Gold (FG) tracer (Fluorochrome, LLC, Denver CO) or 3% DAPI (Sigma, St Louis, MO, USA) were applied at the distal end of the STT or at the carotid nerves, respectively, using a pulled glass pipette. To block SPN axonal transport we followed the procedure used by Albuquerque et al. (1972), briefly, a catheter was inserted into the region of the atlanto-occipital junction, reaching the 6th–8th cervical spinal cord segments, and 10–16 μg colchicine (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in physiological saline solution) was slowly injected intrathecally. To process the SCG for immunostaining, rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (125 mg/kg i.p.) after 7 days (decentralization), 3 days (retrograde labeling of ganglionic neurons) or 5 days (retrograde labeling of SPN and colchicine treatment).

For light microscopy (LM) examination, after deep anesthesia, rats were transcardially perfused with 100 mL of ice-cold phosphate-buffered saline (0.01 M PBS, pH 7.4) for 3 min, and then with 250 mL of ice-cold fixative solution (2% paraformaldehyde, 0.18% picric acid in 0.1 M PBS, pH 7.4), 100 mL for 3 min and the remaining 150 mL for 40 min. The SCG and a spinal cord segment (from C7 to T3) were dissected, postfixed overnight in the same fixative solution, and cryoprotected in sucrose solution (10%–30%, w/v). Horizontal and transverse sections of the spinal cord and longitudinal sections of the SCG (14 μm thickness) were cut using a cryostat at -20°C , recovered on Superfrost Plus slides (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), and processed at room temperature in a humid atmosphere with a routine procedure for single or double immunohistochemical staining. Tissue sections were preincubated for 2 h with 10% bovine serum albumin for all immunostaining or with 10% donkey serum for GAD67. Sections were then incubated overnight with primary polyclonal antibodies directed against ChAT, VAChT, synaptophysin (Syn), methionine enkephalin (mENK), neuropeptide Y (NPY) and GABA_A receptor $\alpha 4$ subunit (GABA_AR $\alpha 4$) or monoclonal anti-GAD67 diluted in 10% donkey serum (Table 1). Due to the low efficiency of the primary antibody against GAD67, the respective sections were preincubated with ImmunoDNA Retriever Citrate solution (1:20; Bio Science for the World, Santa Barbara, CA, USA) for 1 h at 70°C . Tissue sections were rinsed twice for 10 min each in PBS–Triton X-100 (0.1 M PBS, 0.3% Triton X-100), and then incubated for 2 h with an appropriate secondary antibody (Table 1). In both tissues, as a control prior to the immunostaining procedure, the primary antibodies were

TABLE 1 | Antibodies used for immunohistochemistry.

| Antiserum | Type of antibody | Coupled to | Dilution | Source | Catalogue num. |
|------------------------------|-------------------|------------|----------|----------------------------------|----------------|
| Primary | | | | | |
| VAcHT (rat) | Goat polyclonal | – | 1:100 | Promega Corp, Madison, WI, USA | ab27941 |
| ChAT (human) | Goat polyclonal | – | 1:100 | Millipore, Chemicon, MA, USA | AB144P |
| mENK (bovine) | Rabbit polyclonal | – | 1:100 | Millipore, Chemicon, MA, USA | AB5026 |
| Synaptophysin (human) | Rabbit polyclonal | – | 1:200 | Dako Cytomation, Denmark | A0010 |
| GAD 67 (synthetic) | Mouse polyclonal | – | 1:200 | Millipore, Chemicon, MA, USA | MAB5406 |
| NPY | Rabbit polyclonal | – | 1:200 | Bachem, CA, USA | T4070 |
| α 4 GABA _A | Rabbit polyclonal | – | 1:200 | Sigma | 69169 |
| Secondary | | | | | |
| α goat IgG | Donkey | Alexa 488 | 1:500 | Jackson ImmunoResearch Lab, Inc. | 705-545-003 |
| α rabbit IgG | Donkey | Alexa 488 | 1:500 | Jackson ImmunoResearch Lab, Inc. | 711-545-152 |
| α mouse IgG | Donkey | Alexa 594 | 1:700 | Jackson ImmunoResearch Lab, Inc. | 715-515-150 |
| α mouse biotinylated | | | 1:200 | Vector Laboratories | BA-2000 |
| Avidine conjugated HRP (ABC) | | | 1:100 | Vector Laboratories | PK-6100 |

preadsorbed overnight at room temperature with a 10-fold molar excess of their corresponding control antigens 3.0 μ M for GAD67 (Gene Tex, Irvine, CA, USA); 0.1 μ M for ChAT (Chemicon, Temecula, CA, USA) and 1 μ M for the rest (mENK, Sigma, St Louis, MO, USA; Syn, Abcam, Cambridge, MA, USA; GAD67 Millipore, Chemicon Billerica, MA, USA). As another control, some tissue sections were processed through all the incubation steps, but the primary antibodies were omitted. Finally, sections were coverslipped with a fluorescence mounting medium (Dako Fluorescence Mounting Medium, Dako, Santa Clara, CA, USA) and examined with an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E600), equipped with the appropriate filters for Alexa 488, Alexa 594 and Cy5. Selected sections with single or double labeling were further analyzed with a confocal LSM 5 Pascal Zeiss microscope equipped with an argon/krypton laser. Images were collected with a 40 \times objective (1.3 NA/Oil). Confocal images were obtained using at least two separate photomultiplier channels, either concurrently or in separate runs.

For transmission electron microscopy (TEM) examination, rats were deeply anesthetized and transcardially perfused with cold sodium phosphate buffer (PB; 0.1M, pH 7.4) followed by a fixative solution (4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in PBS). After perfusion, SCG were removed, post-fixed for 2 h at 4°C in the same fixative, and transferred to PBS. Then, ganglia were permeabilized by brief exposure to liquid nitrogen followed by a 30% sucrose solution and returned to PBS. Free floating vibratome sections (30 μ m thick) were immunoprocessed in cell culture (24-well) plates, rinsed in 0.1 M PBS, and incubated in 1% sodium borohydride solution for 15 min. Sections were then thoroughly washed in 0.1 M PBS, treated with 10% normal goat serum for 30 min, and incubated for 24 h with the primary antibody against GAD67, 1:100 in 0.1 M PBS containing 3% normal goat serum. The serial sections were washed three times in PBS, incubated in biotinylated horse anti-mouse IgG (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 2 h, washed in PBS, and then treated with avidin conjugated to horseradish peroxidase (to form avidin-biotin complexes; ABC, 1:100; Vector) for 1 h.

Sections were rinsed in PBS, and the peroxidase activity was revealed with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide in PBS for 5 min at room temperature. Sections were block counterstained with 10% uranyl acetate for 1 h, postfixed for 1 h in 1% OsO₄, dehydrated in graded ethanol and embedded in Epon between plastic coverslips. After overnight curing, sections were analyzed by LM and regions with clear immunolabeling were selected to be glued onto Epon blocks and sectioned using an ultramicrotome at a thickness of 3 μ m for LM and 60 nm for TEM. Sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and finally examined using a Jeol 1100 TEM.

Electrophysiological and Pharmacological Studies

Rats were anesthetized with xylazine (10 mg/kg i.m.) and ketamine (90 mg/kg i.p.), then the ganglia were rapidly excised and carefully desheathed. The preganglionic and post-ganglionic nerve roots were trimmed to a length of 3–5 mm, and the ganglia were transferred to a recording chamber (Warner Instruments, Hamden, CT, USA) and bathed with oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Krebs-Ringer Solution, pH 7.4, containing (in mM): 136 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1 KH₂PO₄, 12 NaHCO₃, 11 glucose and 2 μ M atropine. All experiments were carried out at a controlled temperature of 24.0 \pm 0.5°C. For recording and stimulation, the cervical sympathetic trunk (preganglionic) and one of the two postganglionic nerves, i.e., the internal and external carotid nerves (ICN, ECN), were pulled into glass suction electrodes to maintain a seal during recording. Stimuli were applied by a Pulsar 6i Stimulator (FHC Inc., Bowdoin, ME, USA) and consisted of supramaximal square voltage pulses (9–12 V) 0.1 ms in duration at 0.2 Hz. Compound action potentials (CAPs) were recorded from the ICN and ECN, voltage traces were amplified (100 \times) and bandpass filtered by a differential amplifier (DP-301, Warner Instruments, Hamden, CT, USA), and digitized with a multifunction data-acquisition (PCI-DAQ) board with 16-bit A–D converter using

a custom-made acquisition program written in LabView v8.6 (National Instruments, Austin, TX, USA). The basal CAP amplitude was stable for 3–4 h.

Input-output (I/O) curves were constructed by recording the amplitude of CAPs (output) obtained either in the ECN or in the ICN in response to progressively increasing stimulus intensities (input). We evaluated these curves by fitting a logistic function to the data, $V_O = V_M / [1 + ((V_M/V_0) - 1) \times e^{-\alpha V_i}]$ (Banks, 1994), where V_O = output voltage, V_M = maximal response, V_0 = initial response (in our case ≈ 0.005), V_i = input voltage, and coefficient α , related to the slope. We obtained the input value at which the half response occurred by interpolating from the graphs.

To evaluate GABA_AR sensitivity we determined IC₅₀ from dose-response curves, GABA (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) was prepared fresh in Krebs-Ringer solution. To test the effect of GABA, control CAPs were recorded during 3–5 min, then GABA was administered at the concentrations indicated and maximum inhibition was determined. After that, the preparation was washed and once the CAP control amplitude was reestablished, we waited 30 min approximately before a new GABA concentration was tested in the same manner, no more than two GABA concentration were tested in each ganglion at random order.

To evaluate regional differences in the desensitization rate to GABA, and in the sensitivity of GABA_AR to the competitive antagonist picrotoxin (PTX) we compared the ECN and ICN responses as follow: first, we administered 250 μ M GABA and compared the rate of desensitization from maximal inhibited responses in ICN and in ECN. To investigate GABA_AR-sensitivity to PTX, we administered 20 μ M PTX and 5 min later 250 μ M GABA, we determined the level of GABA inhibition obtained in presence of PTX. Sensitivity to this GABA antagonist was also tested in ganglionic plasticity using submaximal stimulation, we applied a 20 Hz, 20 s train to induce a post-train potentiation, then we administered PTX 50 μ M and repeated the train. To compare the potentiation we determined the response amplitude at 30 and 60 min, and the area under the post-train curve in both nerves, ICN and ECN.

Sampling, Assessing Colocalization, and Statistics

Each ganglion was longitudinally sectioned throughout the entire length of its mediolateral axis (ca. 800 μ m) to produce 40–50 slices. We sampled the tissue by collecting at least five slices at three depths (140–210, 350–420, and 560–630 μ m from the edge of the ganglion) and sorted the slices onto different slides. For each ganglion, we selected a slice at random and explored its whole area by scanning with a confocal LSM 5 Pascal Zeiss microscope. For each image, we selected a single confocal plane. After virtual slice reconstruction, using the Metamorph image analysis system (v. 7.5.6; Universal Imaging Corporation, Molecular Devices, Downingtown, PA, USA), we removed out of focus blur by means of deconvolution functions. We then identified the specific labels by selecting puncta optical density (OD) that surpassed the negative staining background

level (i.e., OD > background mean + 2 SD). We assessed the number of overlapping pixels for each marker in double-labeled varicosities. For GAD67 and Syn labels, colocalization is presented as the ratio of the percentage of fibers coexpressing the two labels relative to the percentage of fibers expressing one marker. Thus, a ratio of one corresponds to complete colocalization, whereas a ratio of zero represents completely independent localization. Segregation of the two labels was expressed as the percentage of varicosities expressing a given marker (e.g., GAD67) that did not show staining for a second marker (e.g., VACHT). Thus, 100% segregation indicates that none of the varicosities in a double-labeled section expressed both labels, while 0% denotes that all varicosities expressed both labels. We used four rats to assess immunolabeling of GABA_AR $\alpha 4$ and three animals for each retrograde transport label. Five animals were used for all the others immunolabeling experimental groups. For electrophysiological experiments seven rats were used for the I/O curves and five for the dose-response curves.

To identify through which carotid nerve (ICN or ECN) ganglion neurons project their processes to their targets, we applied different tracers in each of the two carotid nerves, and determined where the differentially marked ganglionic neurons were located. In this way, we divided the ganglion into two regions, one occupied by neurons retrogradely labeled through the ICN and the other by the ECN. Then, in another series of experiments combining GAD67 immunostaining and retrograde labeling, we defined by which nerve the neurons densely contacted by GABA (DCG) preferentially project their processes.

To quantify SPN cell bodies expressing GAD67 and ChAT in the spinal cord, we sectioned it transversally at the levels of the exiting nerve roots or longitudinally, recovering all the tissue slices. We counted the number of cell bodies positive for either GAD67 or ChAT, or for the two markers (colocalization) in the intermediolateral nuclei (IMLn).

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

RESULTS

Presence of GAD67 in Perikarya and Varicosities of SPN

Considering that GAD67 is ten times less expressed in SPN than cholinergic markers, to immunolabel this enzyme in somata of the SPN we used colchicine to block the axonal transport (Albuquerque et al., 1972). Thus, in the spinal cord of colchicine treated rats, immunoreactivity to GAD67 (GAD67-IR) was detected in the cell bodies of ovoid neurons (ca. 20 μ m of the major axis), within and around IMLn. This morphology and location correspond to sympathetic preganglionic neurons (SPN; Deuchars and Lall, 2015). Almost

all of these putative preganglionic GAD67-IR neurons were retrogradely labeled with FG, confirming their preganglionic identity (**Figure 1**). Besides these immunopositive neurons, abundant GAD67-IR staining was found in varicosities surrounding SPN (**Figures 1D,F**).

As expected, some of the axon fibers of SPN arriving into the SCG were GAD67 immunopositive. Thus, GAD67-IR was found in fibers and varicosities unevenly distributed along the ganglia; we found that GAD67-IR was present in a rostro-caudal gradient ($79 \pm 6\%$ in rostral vs. $21 \pm 3\%$ caudal; $P < 0.02$; **Figure 2**). According to its pattern we classified GAD67-IR varicosities into two types: most of them ($80 \pm 2\%$) formed concentric varicose fibers tightly encircling some ganglionic principal neurons (**Figure 2B1**), while the remaining $20 \pm 3\%$ of the GAD67-IR varicose fibers were long interstitial fibers within the neuropil alongside neuronal cell bodies (**Figure 2B2**). We also found a population of neurons densely contacted by concentric GAD67-IR varicosities. These neurons, termed as DCG neurons, could correspond to those described by Wolff et al. (1989) and by Ito et al. (2007).

To explore the origin and synaptic nature of GAD67-IR puncta, we denervated the SCG by full transection of the STT that carry on the axons of sympathetic preganglionic neurons, and performed double immunostaining for GAD67 and for Syn, a synaptic marker. We found that denervation removed all GAD67- and Syn-IR puncta, indicating their preganglionic origin (**Figure 2B6**). By TEM examination, we further demonstrated that GAD67-IR structures display all the ultrastructural features of presynaptic boutons, i.e., a cytoplasmic limiting membrane, small clear vesicles, large dense core synaptic vesicles, mitochondria, a presynaptic active zone and postsynaptic density. The TEM images clearly showed that GAD67-IR was present mainly on small clear vesicles, although some large dense core vesicles were also labeled (**Figure 2B3**). Double GAD67-Syn immunolabeling showed considerable co-localization of these two markers; $80 \pm 3\%$ of GAD67-containing varicosities also expressed Syn (**Figures 2B4,B5**). These data confirmed the preganglionic source and synaptic nature of the GAD67 immunopositive puncta detected in the SCG.

Principal Ganglionic Neurons Express GABA_A Receptor α_4 Subunit

Considering the heterogeneous distribution of ganglionic GAD67-IR varicosities in the SCG, we wondered whether GABA_AR-IR follows a similar topographical distribution. We found that $56 \pm 2\%$ of the principal ganglionic neurons were immunoreactive to GABA_A receptor α_4 subunit; we also detected immunostaining in some neuronal processes that did not correspond to preganglionic fibers since they remained after ganglionic decentralization. Regarding its topographical distribution, like GAD67-IR, GABA_AR α_4 -IR also showed a rostro-caudal gradient; thus, $60 \pm 1\%$ of positive neurons were located in the rostral pole, and the remaining $40 \pm 1\%$ was located in the caudal region ($P < 0.01$). Often, we found a close correspondence between

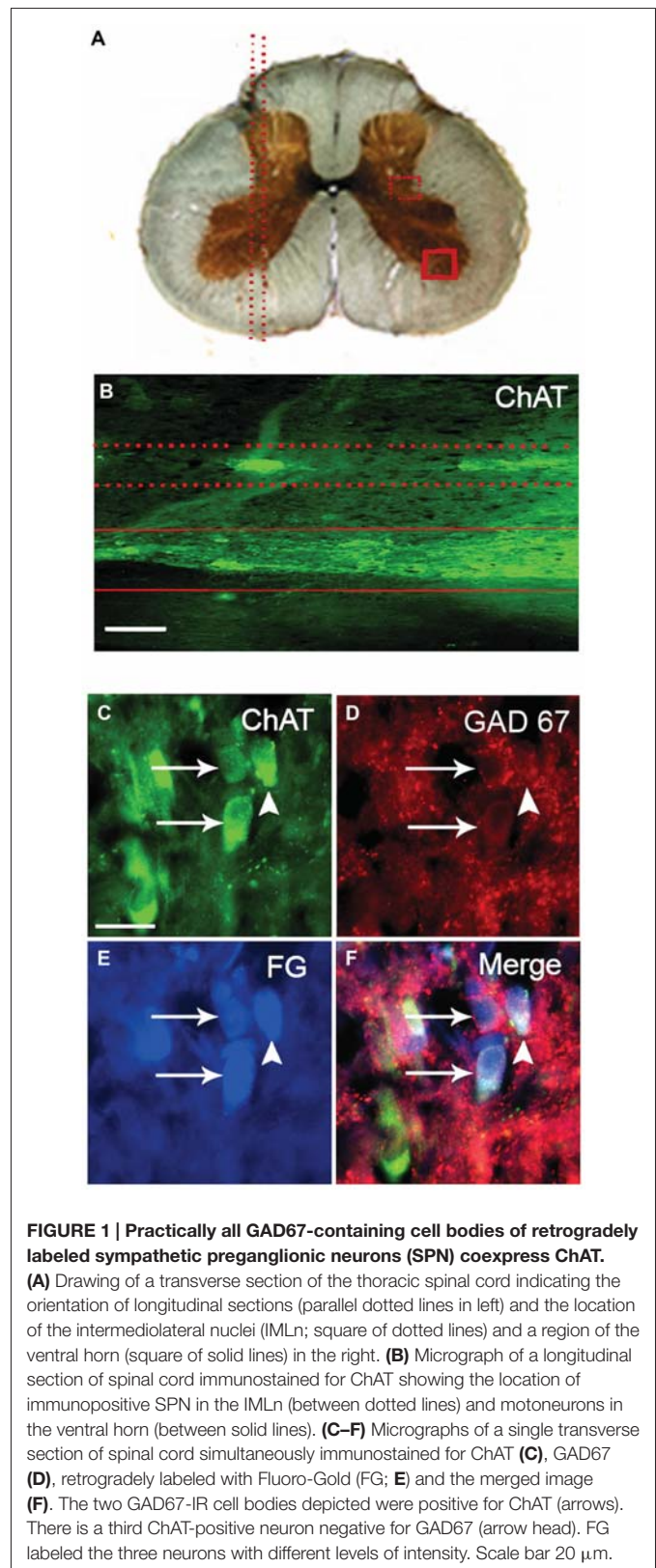


FIGURE 1 | Practically all GAD67-containing cell bodies of retrogradely labeled sympathetic preganglionic neurons (SPN) coexpress ChAT. (A) Drawing of a transverse section of the thoracic spinal cord indicating the orientation of longitudinal sections (parallel dotted lines in left) and the location of the intermediolateral nuclei (IML; square of dotted lines) and a region of the ventral horn (square of solid lines) in the right. (B) Micrograph of a longitudinal section of spinal cord immunostained for ChAT showing the location of immunopositive SPN in the IMLn (between dotted lines) and motoneurons in the ventral horn (between solid lines). (C–F) Micrographs of a single transverse section of spinal cord simultaneously immunostained for ChAT (C), GAD67 (D), retrogradely labeled with Fluoro-Gold (FG; E) and the merged image (F). The two GAD67-IR cell bodies depicted were positive for ChAT (arrows). There is a third ChAT-positive neuron negative for GAD67 (arrow head). FG labeled the three neurons with different levels of intensity. Scale bar 20 μ m.

GAD67-containing varicosities and GABA_AR α_4 -expressing neurons; for example, DCG neurons usually express GABA_AR α_4 -IR (**Figure 3**).

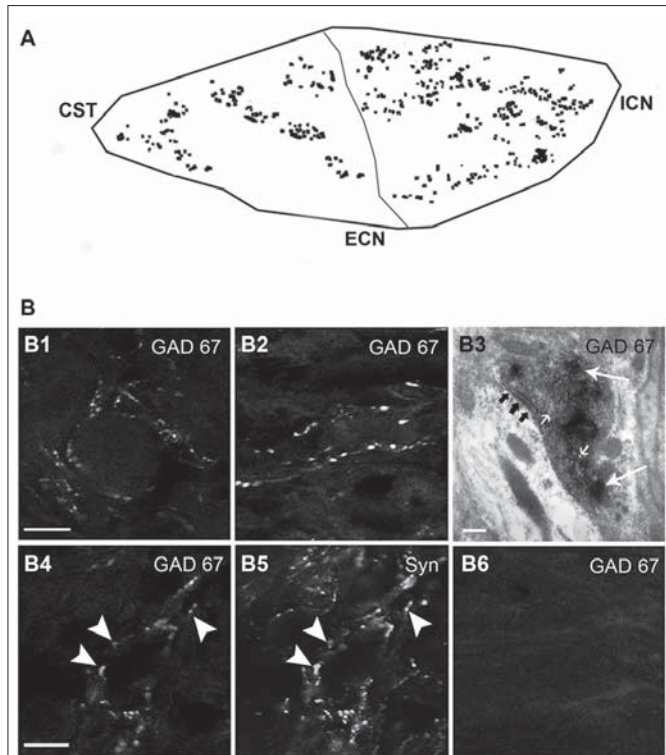


FIGURE 2 | GAD67-containing SPN varicosities exhibit a rostro-caudal gradient. (A) Outline of the regional distribution of GAD67-containing SPN varicosities, ($79 \pm 6\%$ in rostral vs. $21 \pm 3\%$ in caudal; $P < 0.02$) CST, cervical sympathetic trunk; ICN and ECN, internal and external carotid nerves. (B) Micrographs of superior cervical ganglion (SCG) sections immunolabeled for GAD67 (B1–B4, B6) and Syn (B5). GAD67-containing varicose fibers exhibit two forms of local organization: concentric, encircling ganglionic principal neurons ($80 \pm 2\%$; B1) and interstitial in the neuropil alongside neuronal cell bodies ($20 \pm 3\%$; B2). Electron microscopy analysis reveal that the GAD67-IR varicosities show the characteristic features of presynaptic boutons, i.e., small clear vesicles (small arrows), large dense core vesicles (arrows), mitochondria and a presynaptic active zone (black arrows; B3). Practically all GAD67-containing varicosities were also immunoreactive to Syn (B4,B5). Denervation of the ganglia removed all GAD67 staining, indicating its preganglionic origin (B6). Scale bars $20 \mu\text{m}$ and 150nm in (B3).

VACHT is Often Segregated from GAD67-Containing Varicosities

To study the possible co-occurrence of GAD67 with the cholinergic markers ChAT and VACHT, we immunolabeled ChAT and GAD67 in the spinal cord and VACHT and GAD67 in the SCG. We found that, in the spinal cord, all GAD67-IR cell bodies retrogradely labeled with FG also expressed ChAT (Figure 1). In contrast with these results, in the SCG, we found that $44 \pm 5\%$ of the varicosities expressing GAD67-IR lacked VACHT-IR (Figure 4). The discrepancy between the almost complete coexpression of GABAergic and cholinergic markers in preganglionic cell bodies and the predominantly independent location in separate varicosities cannot be explained by a simple random distribution. Rather, it suggests that SPN actively segregate the classical transmitters GABA and ACh into separate varicosities. We did not find differences in the

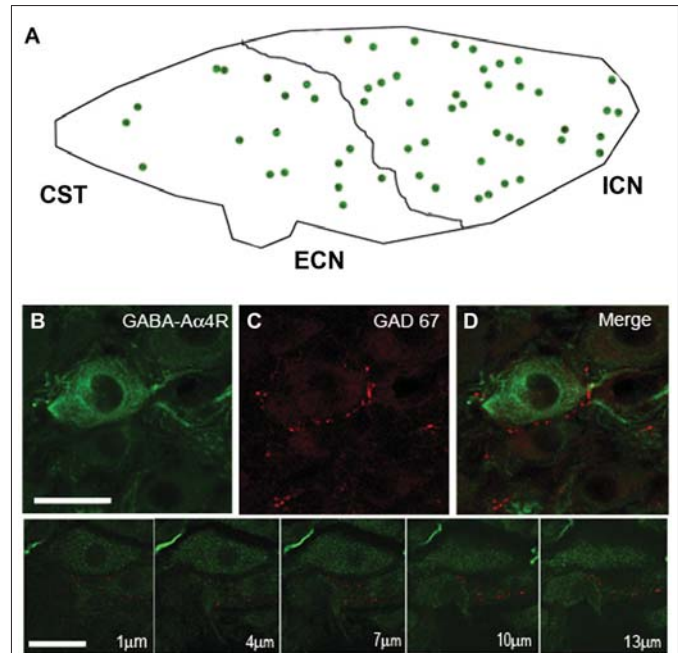
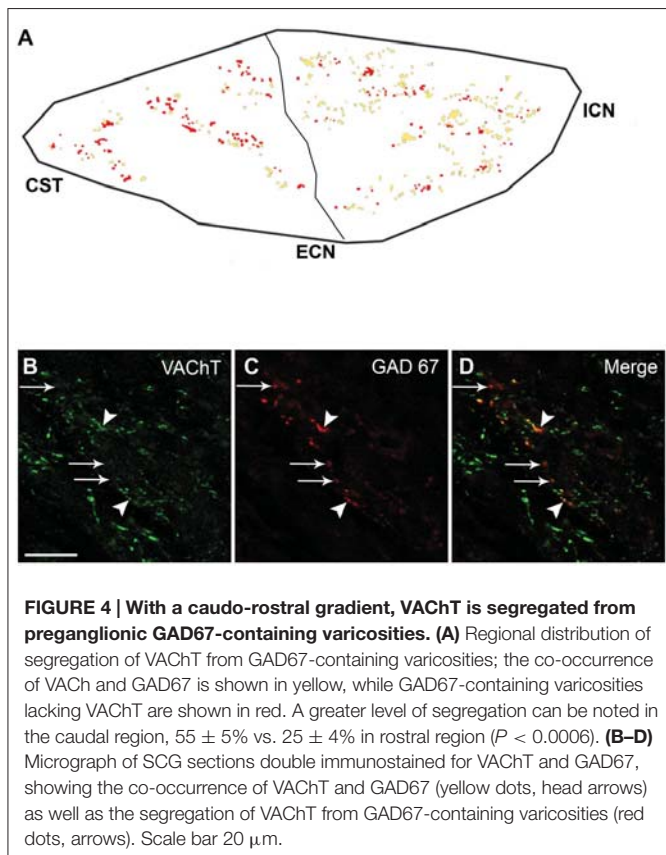


FIGURE 3 | The SCG express immunoreactivity for the GABA_A receptor $\alpha 4$ -subunit (GABA_AR $\alpha 4$) with a rostro-caudal gradient. (A) Regional distribution of GABA_AR $\alpha 4$; $60 \pm 1\%$ in the rostral and $40 \pm 1\%$ in caudal neurons ($P < 0.01$). (B) Micrographs of SCG sections showing immunostaining for GABA_AR $\alpha 4$ and GAD67 (C). The pictures shown in the bottom line correspond to a series of confocal images taken through the Z-axis ($1 \mu\text{m}$ optical section). GABA_AR $\alpha 4$ was detected on the surface and in the cytoplasm of ganglionic principal neurons. A close match between GABA_AR $\alpha 4$ -containing neurons and GAD67-containing varicosities was frequently observed (D) Scale bar $20 \mu\text{m}$.

degree of VACHT segregation in the two types of GAD67-containing varicosities. However, we detected a marked regional difference in the segregation of VACHT and GAD67. Thus, $55 \pm 5\%$ of the GAD67-IR varicosities in the caudal region lacked VACHT immunoreactivity, whereas only $25 \pm 4\%$ of the GAD67-IR varicosities in the rostral region showed segregation ($P < 0.0006$). Consequently, rostral neurons mainly receive innervation from varicosities storing both transmitters, GABA and ACh, while neurons in the caudal region are preferentially innervated by GABA-containing varicosities lacking ACh.

GAD67-IR Varicosities do not Contain Neuropeptide mENK, Another Inhibitory Ganglionic Cotransmitter

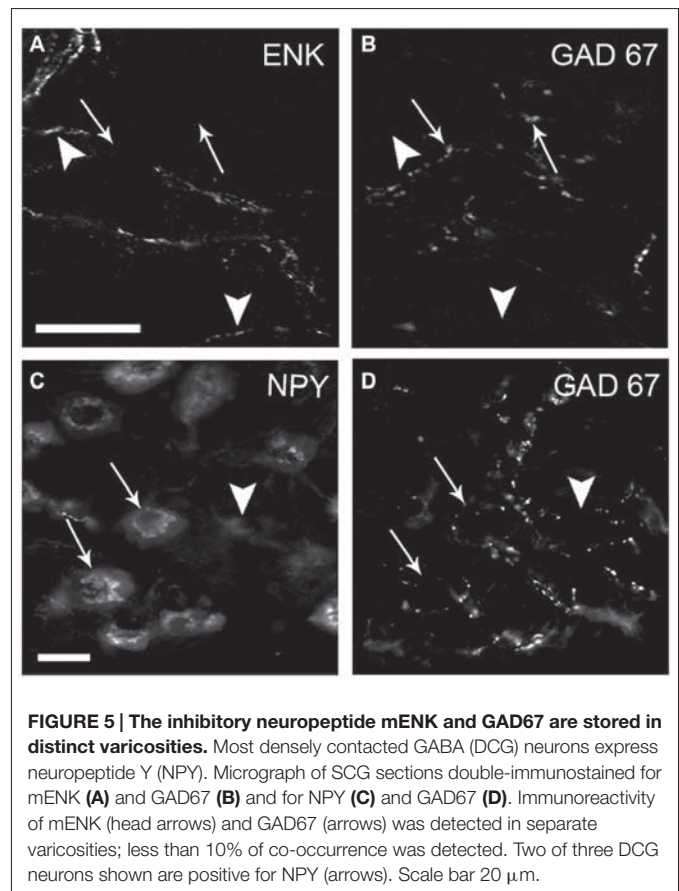
Taking into account the known inhibitory effect of GABA on ganglionic transmission (Adams and Brown, 1975; González-Burgos et al., 1994) we explored whether GABAergic preganglionic varicosities could store another inhibitory cotransmitter such as mENK (Zhang et al., 1995). In the double immunostaining for GAD67 and mENK, we found that most of the GAD67-containing varicosities did not contain mENK ($93 \pm 4\%$; Figures 5A,B). This absence of GAD67 and mENK co-occurrence suggests that SPN exert their inhibitory



actions on ganglionic transmission through different NTs and mechanisms.

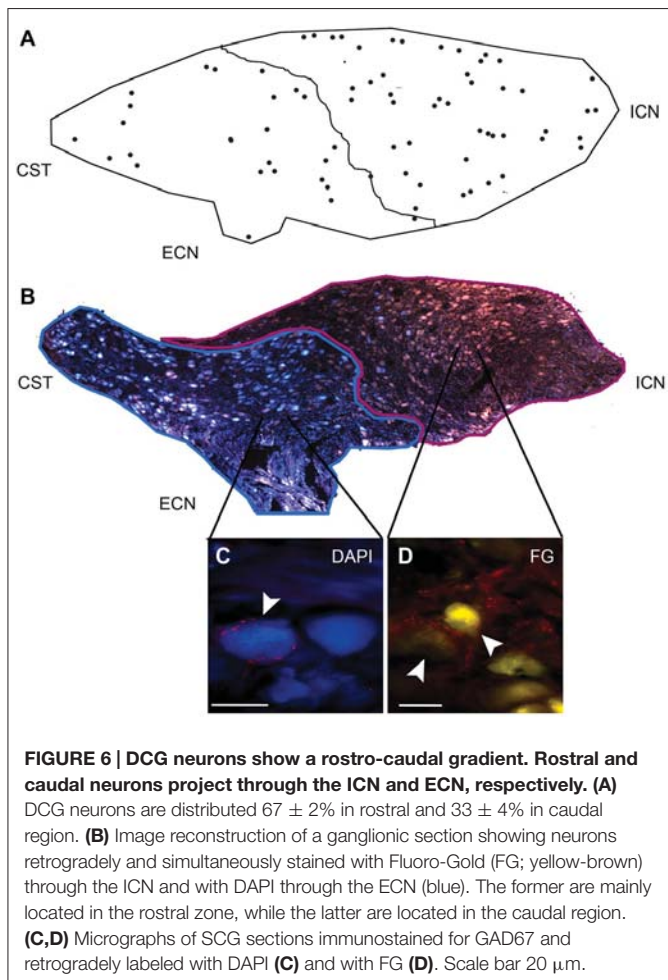
DCG Neurons are Preferentially Located in the Rostral Region and Project Mainly through the ICN

In an attempt to postulate a likely role of GABA in sympathetic function, we characterized DCG neurons. Like Wolff et al. (1989), who described a rostro-caudal distribution of RIG neurons, we detected a rostro-caudal gradient of DCG neurons. We found that 58% of these neurons were located in the rostral pole, while the remaining 42% were found in the caudal region (Figure 6). To determine the ganglionic exit of these two populations, we retrogradely labeled them via the ICN and the ECN. In agreement with previous data (Bowers and Zigmond, 1979; Flett and Bell, 1991), we found that rostral ganglionic neurons project most of their axons through the ICN, while the neurons in the caudal pole project through the ECN (Figure 6B). Consequently, $67 \pm 2\%$ of rostral ganglionic DCG neurons send their axons through the ICN. We further characterized these neurons and found that, regardless their ganglionic location, most of them ($63 \pm 6\%$) were positive for NPY (Figures 5C,D). In summary, most DCG neurons are rostral, NPY-IR and send their axons through the ICN. According to these characteristics, they may correspond to ganglionic vasomotor neurons described elsewhere (Gibbins, 1991; Headley et al., 2005; Li and Horn, 2006).



A Likely Functional Role of the Regional Variation in GAD67-IR and VAcHT-GAD67 Segregation

To determine if there is a correlation between the regional distribution of GABA-IR and classical transmitter segregation with ganglionic transmission, we recorded I/O curves of postganglionic compound action potentials (CAPs) in the ICN and the ECN to assess ganglionic transmission in the rostral and caudal areas, respectively. These curves reflect the number of responsive fibers lying in each postganglionic nerve activated at various stimulus intensities; the curve shifts when the strength of synaptic transmission is changed (Johnston and Wu, 1995). It is clearly seen in Figure 7A that neurons projecting through ECN are activated at lower voltages than those projecting through ICN, reaching higher output values. Thus, at 1 V of input, the ECN output was $0.5 \pm 0.1 \text{ mV}$, whereas in the ICN there was a minimum response, i.e., $0.08 \pm 0.01 \text{ mV}$ ($P = 0.004$). Similarly, $V_{0.5}$ was significantly different ($1.7 \pm 0.1 \text{ V}$ for ECN vs. $2.6 \pm 0.2 \text{ V}$ for ICN; $P = 0.001$). The parameter α (related to the slope) was not significantly different (1.9 ± 0.2 for ECN and 1.8 ± 0.1 for ICN; $P = 0.6$; Figure 7A). These results indicate that ganglionic transmission through caudal neurons and leaving the ganglia through the ECN is stronger than transmission across rostral neurons.

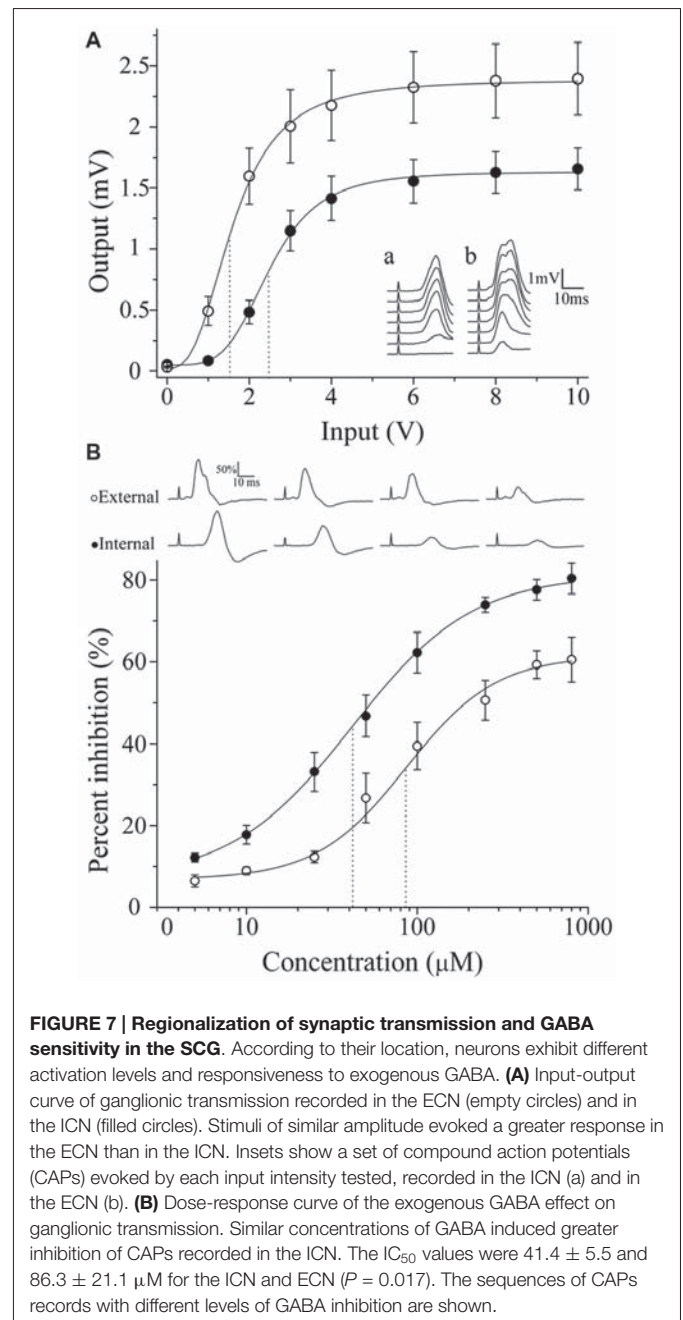


In accordance with the strength of ganglionic transmission, the administration of exogenous GABA induced greater inhibition in the ICN than in the ECN. Thus, $800 \mu\text{M}$ GABA produced 61.5 ± 4.6 and $81.3 \pm 4.5\%$ inhibition in the ECN and ICN transmission, respectively. The IC_{50} values were 41.4 ± 5.5 and $86.3 \pm 21.1 \mu\text{M}$ for the ICN and ECN, respectively (**Figure 7B**; $P = 0.017$).

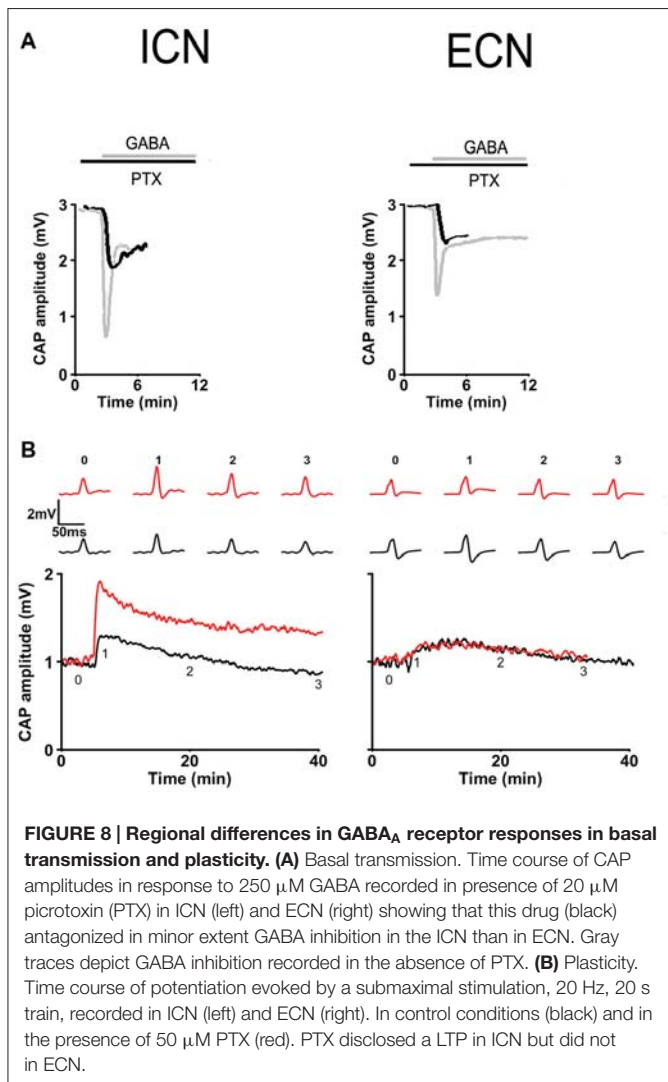
Functional Correlation of Regional Differences in GABA_AR Types

Considering that different GABA_AR types are associated with two modes of GABA inhibition described in the central nervous system (Farrant and Nusser, 2005; Lee and Maguire, 2014), it is valid to assume that regional differences in ganglionic transmission efficiency can be correlated with differential distribution of the GABA_AR. To explore this possible correlation, we compared: the desensitization rate of GABA_AR to exogenous $250 \mu\text{M}$ GABA; the PTX antagonistic effect on the inhibition induced by $250 \mu\text{M}$ GABA; and the effect of PTX on submaximal potentiation; in rostral vs. caudal regions.

We found different desensitization rates to exogenous GABA in the ECN and ICN. (ECN: 16.1 ± 3.1 min; ICN: 2.3 ± 0.8 min; $P < 0.001$). Regarding the effect of PTX on GABA inhibition there was a significant difference in the response obtained in



ECN and ICN, thus, $20 \mu\text{M}$ PTX blocked $61.2 \pm 5.0\%$ of GABA inhibition in the ECN, whereas blocked $80.8 \pm 4.4\%$ in the ICN ($P = 0.01$; **Figure 8A**). We tested the effect of $50 \mu\text{M}$ PTX on a submaximal potentiation and found, as González-Burgos et al. (1997), that with this protocol in control condition a small potentiation arose in rostral region that lasted less than 30 min (area under the curve = 3.9 ± 1.1 a.u.), and that $50 \mu\text{M}$ PTX increased significantly this response to become a long term potentiation lasting 60 min approximately (LTP; area under the curve = 25.7 ± 6.9 a.u.; $P < 0.01$). Similarly, in caudal region LTP was not evoked with the submaximal 20 Hz, 20 s stimulation protocol (area = 3.8 ± 1.2 a.u.), but in contrast with rostral region, $50 \mu\text{M}$ PTX did not disclose LTP



(area = 3.2 ± 1.4 a.u.; **Figure 8B**). These regional differences in sensitivity to GABA and PTX, both in basal transmission and in synaptic plasticity, strongly suggest the presence of different GABA_A receptors type in caudal and rostral ganglionic neurons. It is likely that extrasynaptic receptors were prevalent in the rostral region.

DISCUSSION

In the present study, we demonstrate that cholinergic/GABAergic sympathetic preganglionic neurons *in vivo* segregate ACh and GABA into separate varicosities. We found that preganglionic GAD67-IR and ganglionic somatic GABA_AR $\alpha 4$ subunit-IR showed a rostro-caudal gradient, whereas ACh-GABA segregation showed the opposite caudo-rostral gradient. These heterogeneous distributions of GABAergic innervation, GABA_AR $\alpha 4$ subunit and segregation level correlate with regional differences in ganglionic transmission strength and GABA effects. Thus, synaptic transmission in the caudal region, where GABA and its receptors are expressed to a lesser extent and

ACh and GABA are more segregated, is stronger than in the rostral region. Furthermore, exogenous GABA and the GABA antagonist PTX exert greater inhibition and larger effect on rostral neurons.

We have previously demonstrated the segregation of ACh and NA in separate varicosities of sympathetic ganglionic neurons co-cultured with cardiomyocytes (Vega et al., 2010). Herein, we present evidence of segregation *in vivo* of two classical sympathetic transmitters, ACh and GABA, in intact ganglia. Our data indicate that, like CNS neurons (Hattori et al., 1991; Sulzer and Rayport, 2000; Nishimaru et al., 2005; Kawano et al., 2006; Dal Bo et al., 2008; Shutoh et al., 2008; Amilhon et al., 2010; Kudo et al., 2012; Zhang et al., 2015), sympathetic neurons have the ability to sort classical NTs into separate varicosities in the SCG. Ito et al. (2007) detected preganglionic bouton-like GAD67-IR in the rat SCG, and using double-immunostaining they reported, contrary to our results, complete co-localization of VAcHT with GAD67. However, in the corresponding images (**Figure 4**), it can be observed that some GAD67-containing varicosities lack VAcHT, suggesting some degree of segregation of VAcHT and GABA.

Segregation of transmitters may allow neurons to exert each transmitter function separately. For example, in the retina, it has been shown that starburst amacrine cells process complex visual signals using ACh and GABA independently. These neurotransmitters are released differentially in a Ca²⁺ level-specific manner, suggesting that the two transmitters are released from different vesicle populations (Lee et al., 2010). These authors did not exclude the possibility that ACh- and GABA-containing vesicles can be segregated and released from different presynaptic endings of single axons of amacrine cells.

The presence of GABA immunoreactive-like fiber varicosities in sympathetic ganglia has been previously reported (Kása et al., 1988; Dobó et al., 1989, 1990, 1993; Wolff et al., 1989, 1993; Párducz et al., 1992). We confirmed the presence of GAD67-IR cell bodies, fibers and varicosities of SPN as described by Ito et al. (2007). Similar to the previous work of Wolff et al. (1989), showing richly innervated GABA (RIG)-neurons, and that of Ito et al. (2007) describing neurons surrounded by GAD67-IR basket varicosities, we detected a similar set of neurons that we have called DCG. We confirmed a preferential rostral location of this type of neurons, and also found that DCG neurons are larger, express NPY and mainly project their axons through the ICN. According to these features, it is probable that they correspond to vasomotor neurons (Gibbins, 1991; Li and Horn, 2006).

In addition to confirming the presence of GAD67-IR fiber varicosities, we detected the immunoreactive expression of the GABA_AR $\alpha 4$ subunit mainly within principal ganglion neurons and in some neuronal processes that did not correspond to preganglionic fibers. These results contrast with the report of Amenta et al. (1992) who detected 3H-muscimol binding sites in the rat SCG, primarily accumulated in the neuropil rather than within ganglion neurons. Likewise, the presence of presynaptic GABA_A and GABA_B receptors was inferred by pharmacological studies (Farkas et al., 1986). One possibility of

these discrepancies is that other subunits different to GABA_AR $\alpha 4$ are expressed in presynaptic sites; another explanation is that the level of presynaptic GABA_AR $\alpha 4$ expression was below the immunostaining detection threshold. The presence of GABA_AR $\beta 2/3$ subunits in the rat major pelvic ganglion was demonstrated using immunohistochemistry by Park et al. (2006). The presence of mRNAs for at least 12 subunits of the GABA_AR has been described in the rat SCG (Liu and Burt, 1999).

Wolff et al. (1993) suggested that some of the GABA-containing fibers in the SCG are not preganglionic, but they belong to GABAergic neurons located in the thoracic trunk or in other lower sympathetic ganglia. Accordingly, these authors proposed the existence of a GABA sympathetic interganglionic feed-forward inhibition system (Wolff et al., 1993). Our data, along with those of Ito et al. (2007), do not support this proposal, because denervation removed all the GAD67-IR in the SCG. On the other hand, like Párducz et al. (1992) and Dobó et al. (1993), we found that preganglionic SPN varicosities store GABA and the inhibitory peptide mENK separately.

We wondered whether the different degrees of ACh and GABA segregation, the regional distribution of GAD67-IR varicosities, and GABA_AR $\alpha 4$ subunit expression could be related to the level of GABA inhibition of ganglionic transmission. We indeed found that the greater presence of preganglionic GABAergic varicosities and GABA_AR $\alpha 4$ in the rostral region along with a low level of ACh-GABA segregation is correlated with weaker transmission and greater inhibition by exogenous GABA. In contrast, within the caudal region, where GABA and its receptors are less prevalent, along with a large degree of ACh and GABA segregation, stronger transmission and less GABA inhibition was detected. In accordance with these data, Li and Horn (2006) found that low-threshold (i.e., more excitable) neurons prevail in caudal region than in rostral region.

A relevant issue to be addressed is the possible functional role of the regional differences in ACh-GABA segregation. Both are fast action transmitters, stored in synaptic small clear vesicles; however, ACh is the main excitatory transmitter of the ganglionic synapse, whereas GABA is an inhibitory neurotransmitter of ganglionic transmission. Two types of GABA inhibition have been proposed, depending on receptor localization: if GABA_AR are located at synaptic contacts, they will produce a transient or phasic inhibition, whereas if they are sited extrasynaptically they will produce a broad and long-lasting inhibition, termed tonic inhibition (Farrant and Nusser, 2005). In rostral region, where we found less segregation, ACh and GABA are largely co-stored in the same varicosity, and therefore will be released together regardless of the stimulation frequency. This co-store and coincident release of ACh and GABA, besides the larger presence of GABA and GABA_AR in rostral region, could result in a stronger and more efficient GABA inhibition of cholinergic synaptic transmission. It can be also expected that rostral region would have the high-affinity extrasynaptic receptors that evoke tonic strong inhibition. On the contrary, in caudal region where we found greater segregation, and less presence of GABA and its receptors, the independent and low GABA

release could induce less inhibition or even other types of GABA function. This low inhibition could be also caused by a preferential presence of low-affinity synaptic GABA_AR in this ganglionic region. Different types of GABA inhibition have been reported in regions of the central nervous system, such as the hippocampus, cortex and cerebellum, where GABA exerts either phasic or tonic inhibition (Farrant and Nusser, 2005).

To test our hypothesis that rostral neurons preferentially contain extrasynaptic GABA_AR, we searched specific characteristics that define synaptic and extrasynaptic GABA_AR, such as desensitization rate and sensitivity to GABA and to antagonists like PTX. We found that rostral neurons, recorded through ICN, exhibit, a higher sensitivity to GABA and to PTX, thus this drug blocks more the inhibitory effect of GABA on basal transmission and discloses a LTP with submaximal stimulation in rostral neurons. According to the higher affinity of extrasynaptic GABA_A receptors to GABA and PTX (Semyanov et al., 2003; Farrant and Nusser, 2005; Lee and Maguire, 2014), our electrophysiological and pharmacological evidences provide further support to our proposal that rostral neurons contain a larger proportion of extrasynaptic receptors. Unexpectedly we found faster GABA desensitization on rostral neurons.

Finally, an important open question to be answered is the physiological role of different types of GABA inhibition on ganglionic function. It is possible that rostral neurons (including DCG neurons) positive for NPY and receiving more GABA innervation through varicosities preferentially co-storing ACh and GABA, correspond to vasomotor neurons (Li and Horn, 2006). These rostral neurons reach brain vasculature and blood vessels of rostral head, structures associated with the eye as well as pineal gland (Flett and Bell, 1991); likely, they would require a strong and tonic GABA inhibition to regulate better the vasomotor tone. On the other hand, caudal neurons, largely negative for NPY, that show less GABA innervation through varicosities containing GABA alone, they would correspond to the secretomotor type (Gibbins, 1991; Grkovic and Anderson, 1995; Li and Horn, 2006). These caudal neurons innervate the vasculature of the mouth and jaw, and the skin overlaying the caudal head, and the salivary and thyroid glands (Flett and Bell, 1991; Grkovic and Anderson, 1995); likely, they would require less GABA inhibitory modulation to exert a loose regulation of such targets. It is also feasible that GABA in the caudal region could exert another function instead of inhibition.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DE: main responsible for the experimental work, acquisition and analysis of the data; contributed to the conception and design of the work, also contributed to drafting the work and revising it. RR: responsible for experimental work, acquisition, analysis and interpretation of the electrophysiological data. LAM: responsible for electrophysiological and pharmacological studies on GABA_A receptors, and the acquisition and analysis of data from those studies. MEZ: responsible for the experimental work.

FC: great contribution to the conception and design of the work also contributed to the analysis and interpretation of data, drafting and revising it critically for important intellectual content. MAM: main responsible of the conception and design of the work, interpretation of data, drafting the work, writing the final manuscript. DE, RR, LAM, MEZ, FC, and MAM: approved the final version and were accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

REFERENCES

- Adams, P. R., and Brown, D. A. (1975). Actions of gamma-aminobutyric acid on sympathetic ganglion cells. *J. Physiol.* 250, 85–120. doi: 10.1113/jphysiol.1975.sp011044
- Albuquerque, E. X., Warnick, J. E., Tasse, J. R., and Sansone, F. M. (1972). Effects of vinblastine and colchicine on neural regulation of the fast and slow skeletal muscles of the rat. *Exp. Neurol.* 37, 607–634. doi: 10.1016/0014-4886(72)90103-3
- Amenta, F., Bronzetti, E., Cavallotti, C., Felici, L., Ferrante, F., and Collier, W. L. (1992). Autoradiographic localization of the gamma-aminobutyric acid type A receptor agonist 3H-muscimol in the rat superior cervical ganglion. *Pharmacology* 44, 107–112. doi: 10.1159/000138879
- Amillon, B., Lepicard, E., Renoir, T., Mongeau, R., Popa, D., Poirel, O., et al. (2010). VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety. *J. Neurosci.* 30, 2198–2210. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5196-09.2010
- Banks, R. B. (1994). *Growth and Diffusion Phenomena: Mathematical Frameworks and Applications*. Berlin: Springer-Verlag.
- Bowers, C. W., and Zigmond, R. E. (1979). Localization of neurons in the rat superior cervical ganglion that project into different postganglionic trunks. *J. Comp. Neurol.* 185, 381–391. doi: 10.1002/cne.901850211
- Burnstock, G. (1976). Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1, 239–248. doi: 10.1016/0306-4522(76)90054-3
- Burnstock, G. (1990). The fifth Heymans memorial lecture—Ghent, February 17, 1990. Co-transmission. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 304, 7–33.
- Chan-Palay, V., and Palay, S. L. (1984). *Coexistence of Neuroactive Substances in Neurons*. New York, NY: John Wiley & Sons.
- Chanthaphavong, R. S., Murphy, S. M., and Anderson, C. R. (2003). Chemical coding of sympathetic neurons controlling the tarsal muscle of the rat. *Auton. Neurosci.* 105, 77–89. doi: 10.1016/s1566-0702(03)00045-6
- Dal Bo, G., Bérubé-Carrière, N., Mendez, J. A., Leo, D., Riad, M., Descarries, L., et al. (2008). Enhanced glutamatergic phenotype of mesencephalic dopamine neurons after neonatal 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience* 156, 59–70. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.07.032
- Deuchars, S. A., and Lall, V. K. (2015). Sympathetic preganglionic neurons: properties and inputs. *Compr. Physiol.* 5, 829–869. doi: 10.1002/cphy.c140020
- Dobó, E., Joó, F., and Wolff, J. R. (1993). Distinct subsets of neuropeptide Y-negative principal neurons receive basket-like innervation from enkephalergic and gabaergic axons in the superior cervical ganglion of adult rats. *Neuroscience* 57, 833–844. doi: 10.1016/0306-4522(93)90028-e
- Dobó, E., Kása, P., Joó, F., Wenthold, R. J., and Wolff, J. R. (1990). Structures with GABA-like and GAD-like immunoreactivity in the cervical sympathetic ganglion complex of adult rats. *Cell Tissue Res.* 262, 351–361. doi: 10.1007/bf00309890
- Dobó, E., Kása, P., Wenthold, R. J., Joó, F., and Wolff, J. R. (1989). Evidence for GABAergic fibers entering the superior cervical ganglion of rat from the preganglionic nerve trunk. *Histochemistry* 92, 133–136. doi: 10.1007/bf00490232
- Dun, N. J., and Karczmar, A. G. (1979). Actions of substance P on sympathetic neurons. *Neuropharmacology* 18, 215–218. doi: 10.1016/0028-3908(79)90064-9
- El Mestikawy, S., Wallén-Mackenzie, A., Fortin, G. M., Descarries, L., and Trudeau, L. E. (2011). From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 204–216. doi: 10.1038/nrn2969
- Farkas, Z., Kása, P., Balcar, V. J., Joó, F., and Wolff, J. R. (1986). Type A and B GABA receptors mediate inhibition of acetylcholine release from cholinergic nerve terminals in the superior cervical ganglion of rat. *Neurochem. Int.* 8, 565–572. doi: 10.1016/0197-0186(86)90193-2
- Farrant, M., and Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA_A receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 215–229. doi: 10.1038/nrn1625
- Feldberg, W., and Gaddum, J. H. (1934). The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion. *J. Physiol.* 81, 305–319. doi: 10.1113/jphysiol.1934.sp003137
- Flett, D. L., and Bell, C. (1991). Topography of functional subpopulations of neurons in the superior cervical ganglion of the rat. *J. Anat.* 177, 55–66.
- Gibbins, I. L. (1991). Vasomotor, pilomotor and secretomotor neurons distinguished by size and neuropeptide content in superior cervical ganglia of mice. *J. Auton. Nerv. Syst.* 34, 171–183. doi: 10.1016/0165-1838(91)90083-f
- González-Burgos, G. R., Biali, F. I., and Cardinali, D. P. (1997). Picrotoxin-sensitive receptors mediate gamma-aminobutyric acid-induced modulation of synaptic plasticity in rat superior cervical ganglion. *Brain Res.* 751, 148–151. doi: 10.1016/s0006-8993(97)00021-8
- González-Burgos, G. R., Biali, F. I., Nicola Siri, L. C., and Cardinali, D. P. (1994). Effect of gamma-aminobutyric acid on synaptic transmission and long-term potentiation in rat superior cervical ganglion. *Brain Res.* 658, 1–7. doi: 10.1016/s0006-8993(09)90002-6
- Gutiérrez, R. (2009). “Ex uno plures: out of one, many,” in *Co-Existence and Co-Release of Classical Neurotransmitters*, ed. R. Gutiérrez (New York, NY: Springer), 15–22.
- Grkovic, I. and Anderson, C. R. (1995). Calretinin-containing preganglionic nerve terminals in the rat superior cervical ganglion surround neurons projecting to the submandibular salivary gland. *Brain Res.* 684, 127–135. doi: 10.1016/0006-8993(95)00392-4
- Hattori, T., Takada, M., Moriizumi, T., and van der Kooy, D. (1991). Single dopaminergic nigrostriatal neurons form two chemically distinct synaptic types: possible transmitter segregation within neurons. *J. Comp. Neurol.* 309, 391–401. doi: 10.1002/cne.903090308
- Headley, D. B., Suhan, N. M., and Horn, J. P. (2005). Rostro-caudal variations in neuronal size reflect the topography of cellular phenotypes in the rat superior cervical sympathetic ganglion. *Brain Res.* 1057, 98–104. doi: 10.1016/j.brainres.2005.07.029
- Hökfelt, T., Elfvin, L. G., Elde, R., Schultzberg, M., Goldstein, M., and Luft, R. (1977). Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3587–3591. doi: 10.1073/pnas.74.8.3587
- Ito, T., Hioki, H., Nakamura, K., Tanaka, Y., Nakade, H., Kaneko, T., et al. (2007). Gamma-aminobutyric acid-containing sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord send their axons to the superior cervical ganglion. *J. Comp. Neurol.* 502, 113–125. doi: 10.1002/cne.21309

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Dr. John P. Horn (Pittsburgh University) for his critical reading and suggestions. We also thank Pedro Medina for his technical assistance. This work was supported by CONACYT, México, Grants #128332, 236903, and by DGAPA-PAPIIT IN208312. DE was a PhD student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and received a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

- Ito, T., Iino, S., and Nojyo, Y. (2005). A part of cholinergic fibers in mouse superior cervical ganglia contain GABA or glutamate. *Brain Res.* 1046, 234–238. doi: 10.1016/j.brainres.2005.04.018
- Jan, Y. N., Jan, L. Y., and Kuffler, S. W. (1979). A peptide as a possible transmitter in sympathetic ganglia of the frog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 76, 1501–1505. doi: 10.1073/pnas.76.3.1501
- Johnston, D., and Wu, S. (1995). *Foundations of Cellular Neurophysiology*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Kása, P., Joó, F., Dobó, E., Wenthold, R. J., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., et al. (1988). Heterogeneous distribution of GABA-immunoreactive nerve fibers and axon terminals in the superior cervical ganglion of adult rat. *Neuroscience* 26, 635–644. doi: 10.1016/0306-4522(88)90170-4
- Kawano, M., Kawasaki, A., Sakata-Haga, H., Fukui, Y., Kawano, H., Nogami, H., et al. (2006). Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 498, 581–592. doi: 10.1002/cne.21054
- Kudo, T., Uchigashima, M., Miyazaki, T., Konno, K., Yamasaki, M., Yanagawa, Y., et al. (2012). Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. *J. Neurosci.* 32, 18035–18046. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4057-12.2012
- Lee, S., Kim, K., and Zhou, Z. J. (2010). Role of ACh-GABA cotransmission in detecting image motion and motion direction. *Neuron* 68, 1159–1172. doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.031
- Lee, V., and Maguire, J. (2014). The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type. *Front. Neural Circuits* 8:3. doi: 10.3389/fncir.2014.00003
- Li, C., and Horn, J. P. (2006). Physiological classification of sympathetic neurons in the rat superior cervical ganglion. *J. Neurophysiol.* 95, 187–195. doi: 10.1152/jn.00779.2005
- Liu, Z. F., and Burt, D. R. (1999). GABA_A receptor subunit mRNAs in rat superior cervical ganglia. *Pharmacology* 58, 51–58. doi: 10.1159/000028268
- Merighi, A. (2002). Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog. Neurobiol.* 66, 161–190. doi: 10.1016/s0301-0082(01)00031-4
- Morales, M. A., Holmberg, K., Xu, Z., Cozzari, C., Hartman, B., Emson, P., 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. U S A* 92, 11819–11823. doi: 10.1073/pnas.92.25.11819
- Nishimaru, H., Restrepo, C. E., Ryge, J., Yanagawa, Y., and Kiehn, O. (2005). Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102, 5245–5249. doi: 10.1073/pnas.0501331102
- Párducz, A., Dobó, E., Joó, F., and Wolff, J. R. (1992). Termination pattern and fine structural characteristics of GABA- and [Met]enkephalin-containing nerve fibers and synapses in the superior cervical ganglion of adult rat. *Neuroscience* 49, 963–971. doi: 10.1016/0306-4522(92)90372-9
- Park, J. C., Song, D. Y., Lee, J. S., Kong, I. D., Jeong, S. W., Lee, B. H., et al. (2006). Expression of GABAA receptor beta2/3 subunits in the rat major pelvic ganglion. *Neurosci. Lett.* 403, 35–39. doi: 10.1016/j.neulet.2006.04.051
- Sámano, C., Cifuentes, F., and Morales, M. A. (2012). Neurotransmitter segregation: functional and plastic implications. *Prog. Neurobiol.* 97, 277–287. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.04.004
- Sámano, C., Zetina, M. E., Cifuentes, F., and Morales, M. A. (2009). Segregation of met-Enkephalin from VAcHT and ChAT in sympathetic preganglionic varicosities mostly lacking synaptophysin and synaptotagmin. *Neuroscience* 163, 180–189. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.06.010
- Sámano, C., Zetina, M. E., Marín, M. A., Cifuentes, F., and Morales, M. A. (2006). Choline acetyl transferase and neuropeptide immunoreactivities are colocalized in somata, but preferentially localized in distinct axon fibers and boutons of cat sympathetic preganglionic neurons. *Synapse* 60, 295–306. doi: 10.1002/syn.20300
- Semyanov, A., Walker, M. C., and Kullmann, D. M. (2003). GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nat. Neurosci.* 6, 484–490. doi: 10.1038/nn1043
- Senba, E., Kaneko, T., Mizuno, N., and Tohyama, M. (1991). Somato-, branchio- and visceromotor neurons contain glutaminase-like immunoreactivity. *Brain Res. Bull.* 26, 85–97. doi: 10.1016/0361-9230(91)90193-N
- Shutoh, F., Ina, A., Yoshida, S., Konno, J., and Hisano, S. (2008). Two distinct subtypes of serotonergic fibers classified by co-expression with vesicular glutamate transporter. *Neurosci. Lett.* 432, 132–136. doi: 10.1016/j.neulet.2007.12.050
- Sossin, W. S., Sweet-Cordero, A., and Scheller, R. H. (1990). Dale's hypothesis revised: differential neuropeptides derived from a common precursor are targeted to different processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 87, 4845–4848. doi: 10.1073/pnas.87.12.4845
- Sulzer, D., and Rayport, S. (2000). Dale's principle and glutamate corelease from ventral midbrain dopamine neurons. *Amino Acids* 19, 45–52. doi: 10.1007/s007260070032
- Vega, A., Luther, J. A., Birren, S. J., and Morales, M. A. (2010). Segregation of the classical transmitters norepinephrine and acetylcholine and the neuropeptide Y in sympathetic neurons: modulation by CNTF or prolonged growth in culture. *Dev. Neurobiol.* 70, 913–928. doi: 10.1002/dneu.20834
- von Euler, U. S. (1946). A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (sympathin) and its relations to adrenaline and nor-adrenaline. *Acta Physiol. Scand.* 12, 73–97. doi: 10.1111/j.1748-1716.1946.tb00368.x
- Wolff, J. R., Joó, F., and Kása, P. (1987). "Synaptic, metabolic and morphogenetic effects of GABA in the superior cervical ganglion of rat," in *Neurotrophic Activity of GABA During Development*, eds D. A. Redburn and A. Sehousboe (New York, NY: Alan R. Liss, Inc), 221–252.
- Wolff, J. R., Joó, F., and Kása, P. (1993). Modulation by GABA of neuroplasticity in the central and peripheral nervous system. *Neurochem. Res.* 18, 453–461. doi: 10.1007/bf00967249
- Wolff, J. R., Joó, F., Kása, P., Storm-Mathisen, J., Toldi, J., and Balcar, V. J. (1986). Presence of neurons with GABA-like immunoreactivity in the superior cervical ganglion of the rat. *Neurosci. Lett.* 71, 157–162. doi: 10.1016/0304-3940(86)90551-3
- Wolff, J. R., Kása, P., Dobo, E., Wenthold, R. J., and Joo, F. (1989). Quantitative analysis of the number and distribution of neurons richly innervated by GABA-immunoreactive axons in the rat superior cervical ganglion. *J. Comp. Neurol.* 282, 264–273. doi: 10.1002/cne.902820208
- Zhang, C., Bachoo, M., Morales, M., Collier, B., and Polosa, C. (1995). The site of the inhibitory action of endogenous opioids in the superior cervical ganglion of the cat. *Brain Res.* 68, 59–64. doi: 10.1016/0006-8993(95)00360-3
- Zhang, S., Qi, J., Li, X., Wang, H. L., Britt, J. P., Hoffman, A. F., et al. (2015). Dopaminergic and glutamatergic microdomains in a subset of rodent mesoaccumbens axons. *Nat. Neurosci.* 18, 386–392. doi: 10.1038/nn.3945

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Elinos, Rodríguez, Martínez, Zetina, Cifuentes and Morales. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.