



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESPECIALIZACIÓN EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
APLICADA A CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DESCRIPCIÓN DE LA MITOCONDRIA EN CÉLULAS DEL
NÚCLEO MEDIO DEL CUERPO TRAPEZOIDE DE LA RATA**

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA APLICADA A CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A:

JOSÉ ANTONIO HERNÁNDEZ SANTOS



**DIRECTORAS:
DRA. MARISOL OROZCO IBARRA
ESP. FRANCISCA FERNÁNDEZ VALVERDE**

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2018



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.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	3
1. Generalidades de la mitocondria	3
1.1. Anatomía gruesa y fina de la mitocondria	3
1.2 Membrana interna y crestas mitocondriales	6
2. Microscopía Electrónica en mitocondrias del sistema nervioso central.....	2
2.1 Mitocondrias del Sistema Nervioso Central: Neurona y Glía.....	6
3. Mitocondrias del Núcleo Medio del Cuerpo Trapezoide (MNTB).....	8
3.1 ¿Qué es el MNTB?	8
3.2 Mitocondrias en el MNTB	9
JUSTIFICACIÓN	12
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y MÉTODO	13
Animales.....	13
Inmunofluorescencia.....	13
Microscopía electrónica de transmisión	14
Análisis de datos.....	15
RESULTADOS	16
Distribución del marcaje mitocondrial en inmunofluorescencia del MNTB	16
Observación de células principales del MNTB en cortes semi finos	17
Microscopía Electrónica de Transmisión del MNTB.....	18
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	24
REFERENCIAS	25

Introducción.

1. Generalidades de la mitocondria.

1.1 Anatomía gruesa y fina de la mitocondria.

La descripción de la mitocondria ha llamado la atención desde el perfeccionamiento de los microscopios de luz, siendo que a mediados del siglo XIX, donde Kolliker en 1850 describió unos primeros gránulos en el citoplasma de algunas células, aunque fue hasta 1890 cuando Altman, desarrollando métodos más precisos de fijación y tinción permitieron reconocer la distribución de dicho organelo en el citoplasma de células hepáticas (Scheffler, 2008) (Vázquez Memije & Tuena de Gómez, 2002).

Fue en 1893 cuando el término “mitocondria” se acuñó formalmente por Benda, cuyo origen etimológico viene del griego *mitochondrion* (mito: hilo o hebra; chondrion: gránulo), que significa *hebra granulada* (Vázquez Memije & Tuena de Gómez, 2002), atribuido por aquellas primeras observaciones descritas anteriormente.

La mitocondria es el organelo dentro de la célula de entre 3 y 4 μm de largo y aproximadamente 1 μm de ancho, que lleva a cabo las transformaciones energéticas mediante procesos de transducción de energía a lo largo de toda su estructura (Alberts et al, 2015) (Scheffler, 2008). Por ello, a este organelo se le ha denominado a lo largo de la historia como la “central energética” de la célula que, mediante reacciones de oxidación y reducción, liberan energía combustible en forma de Adenosín Trifosfato (ATP) (Scheffler, 2008) (Vázquez Memije & Tuena de Gómez, 2002).

Hasta el año de 1953, Palade realizó los primeros estudios de la mitocondria por microscopía electrónica de transmisión, obteniendo una descripción general de la estructura mitocondrial que aún sigue vigente en nuestros días (Palade, 1953).

La mitocondria contiene dos sacos membranosos, uno conteniendo al otro, delimitándose el saco externo por las membranas externa e interna, y el saco interno (o mejor conocido como matriz mitocondrial), contenido por la membrana interna

(Alberts et al, 2015) (Palade, 1953) (Vázquez Memije & Tuena de Gómez, 2002) (Fig 1.1).

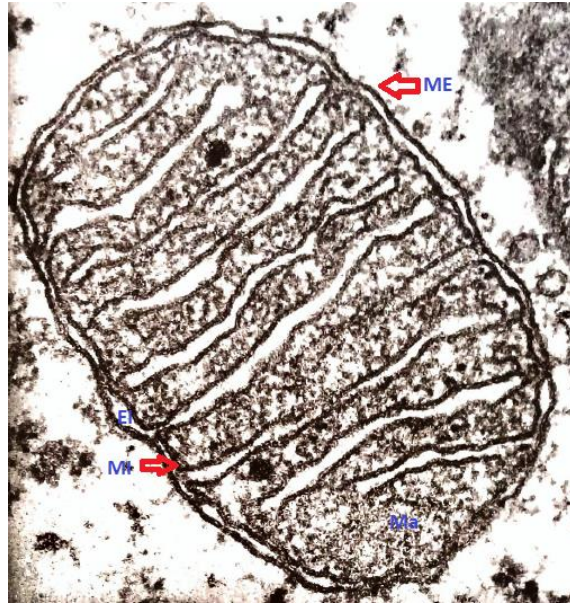


Fig 1.1- Estructura general de la mitocondria. Se pueden distinguir claramente la membrana externa (ME), circundante a todo el organelo y paralela a la membrana interna (MI), cuya estructura permite la formación del espacio intermembranal (EI), que se extiende gracias a los pliegues de la membrana interna que forman a las crestas (espacios en blanco en paralelo, al interior). La membrana interna contiene a la matriz mitocondrial (Ma), la cual a su vez es rica en compuestos orgánicos, por lo que se logra distinguir al microscopio electrónico un ligero contraste grisáceo. (Célula hepática. Modificada de (Scheffler, 2008).

La membrana externa se observa como una superficie lisa, relativamente continua y con pequeñas depresiones que, en un plano tridimensional, forman los poros mitocondriales. Esta membrana es diferenciable por su alto contenido en colesterol y una permeabilidad que permite el paso de moléculas de hasta 5 kDa (Scheffler, 2008) (Vázquez Memije & Tuena de Gómez, 2002). En contraste, la membrana interna contiene de manera exclusiva el fosfolípido cardiolipina, presentando una serie de pliegues que forman las llamadas crestas mitocondriales y con una selectividad más especializada con respecto a la membrana externa, pues solamente se permite el paso de algunos compuestos específicos mediante acarreadores especializados (Alberts et al,2015). Ambas membranas tienen el mismo grosor, estimado en 90 Å (Scheffler, 2008) (Vázquez Memije & Tuena de Gómez, 2002).

Al microscopio electrónico, las mitocondrias varían de forma, tamaño, número de crestas y área ocupada por la matriz dependiendo de la especie e incluso el tejido estudiado (Figura 1.2), habiendo casos como los parásitos de la malaria o algunas levaduras que presentan ausencia de crestas mitocondriales ante el desarrollo en ambientes de anaerobiosis (Alberts et al, 2015) (Scheffler, 2008) (Shulz et al., 2015).

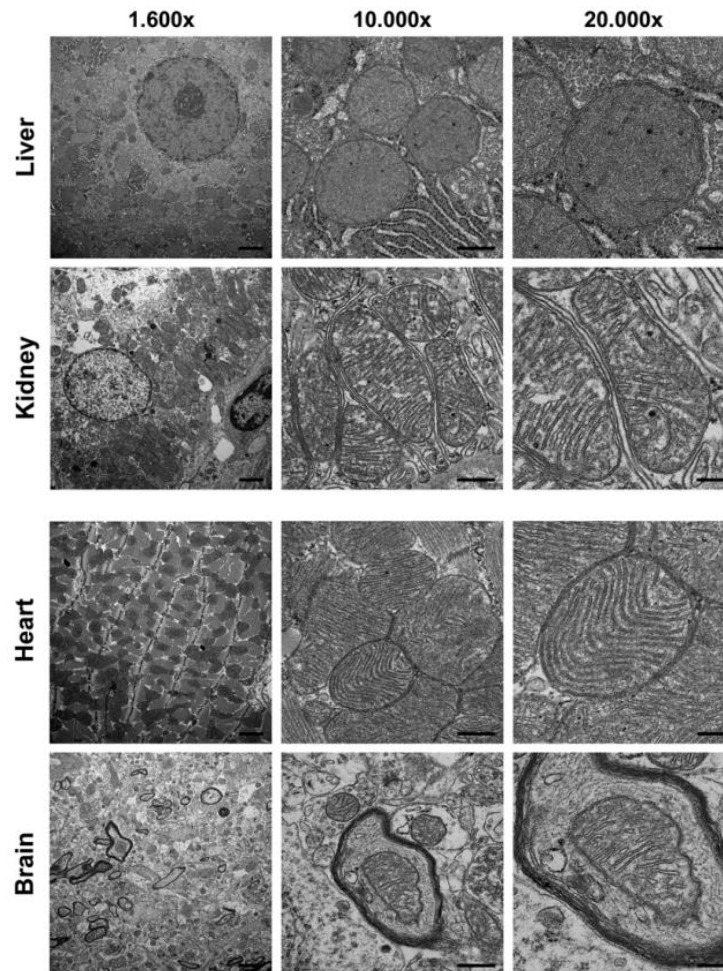


Fig. 1.2.- Variabilidad en las mitocondrias en diferentes tejidos. Se puede observar que la forma, cantidad de crestas y distribución varía entre tejidos, teniendo algunos con una cantidad evidentemente mayor de mitocondrias (corazón) como algunos con una cantidad más discreta (cerebro). (Tomado de Schulz, 2015).

La mitocondria se ha descrito como un organelo sumamente dinámico, no sólo en los procesos bioquímicos que realiza para el sostén de la vida de la célula, sino que también en el sentido de la interacción física con otros componentes celulares o con otras mitocondrias (Vázquez Memije & Tuena de Gómez, 2002), pudiéndose presentar fenómenos de división (fisión) mitocondrial, que se presentan cuando el

organelo ha alcanzado un tamaño considerable para que, mediante fisión binaria, se genere un par de mitocondrias jóvenes o de fusión mitocondrial que es aquel proceso en el cual las mitocondrias cercanas pueden unir sus membranas entre sí y formar un complejo mitocondrial, el cual se ha observado que incrementa la eficiencia en la producción de ATP, además de que se ha propuesto como un mecanismo compensatorio ante su deficiencia, así como un mayor control en la señalización del calcio y la ruta de la apoptosis, así como el incremento en la eficiencia de la homeostasis celular célula (Hoitzing, Johnston, & Johnes, 2015) (Liesa, Palacín, & Zorzano, 2009) (Scheffler, 2008)

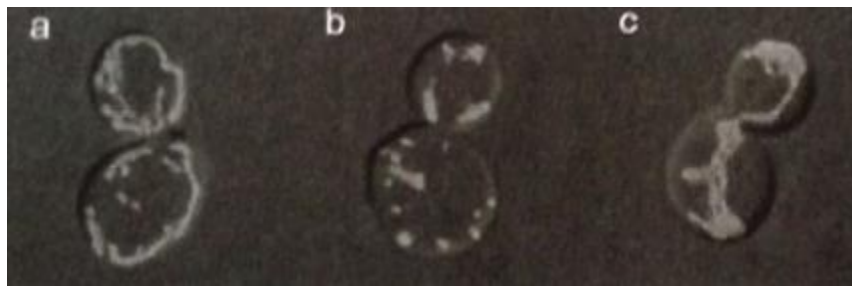


Fig 1.3.- Dinámica mitocondrial. Se dirigió la proteína verde fluorescente (GFP) a la matriz mitocondrial. El grupo silvestre (a) muestra una distribución homogénea entre ambas mitocondrias, mientras que la mutante contra fusión (*fzo1Δ*, en b) muestra matrices totalmente segregadas. En contraste, en c se observa la mutante contra fisión (*mmm1Δ*), con una continuidad clara y compacta entre ambas matrices. (Tomado de (Scheffler, 2008)).

1.2 Membrana interna y crestas mitocondriales.

La estructura fina de la mitocondria obedece a la alta demanda de metabolitos que son inherentes a los diversos procesos bioquímicos para el mantenimiento homeostático y buen funcionamiento de la célula. Como se pudo observar en la sección previa, la membrana interna mitocondrial se extiende de tal manera que forma crestas, lo cual posibilita el que ocupe un mayor volumen, implicando un incremento en la eficiencia en la generación de productos bioenergéticos (Alberts et al., 2015).

Por ello, dicha estructura demanda una alta especialización, con lo cual las proteínas que se expresan y se adosan a la membrana interna evolucionaron en función de adaptarse a la mejor forma para aprovechar las características biofísicas

de la composición de la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana (Scheffler, 2008).

En la membrana interna se pueden localizar cinco grandes complejos proteicos que, en su conjunto, permiten generar de manera altamente eficiente la moneda energética por excelencia de la célula: el ATP. Dado el funcionamiento, al conjunto de dichos complejos (I – IV) se les conoce como la cadena respiratoria, pues en cada uno suceden diferentes eventos bioquímicos que permiten al siguiente utilizar el gradiente energético generado con el fin de producir ATP (en el complejo V, mediante fosforilación oxidativa). (Alberts et al, 2015) (Scheffler, 2008) (Vázquez Memije & Tuena de Gómez, 2002).

Se ha sugerido que la cantidad de crestas mitocondriales, su volumen con respecto al volumen total del organelo y el radio de las mismas con respecto al área de la matriz mitocondrial, pueden tener una relación directa con las demandas energéticas del tejido (Alberts et al, 2015) (Scheffler, 2008) (Vázquez Memije & Tuena de Gómez, 2002).

2. Microscopía electrónica en mitocondrias del sistema nervioso central

2.1 Mitocondrias del Sistema Nervioso Central: Neurona y Glía.

Palade en 1955 y Pysh & Khan en 1971 especulaban sobre las diferencias morfológicas de los diversos tejidos, siendo un caso particular el estudio del Sistema Nervioso Central (SNC) (Palade, 1953; Pysh & Khan, 1971).

El SNC puede observarse de manera general desde los grupos de células neuronales y el de las células gliales. Las primeras (neuronas), tienen como característica primordial la capacidad de generar un potencial de acción desde su cono axónico, gracias a la diferencia de potencial entre la membrana celular y el medio extracelular, por medio del intercambio iónico (principalmente Na⁺, K⁺ y Cl⁻), lo cual es la base de la comunicación entre este tipo de células, por lo que su morfología está encaminada a dicho evento, desarrollando prolongaciones llamadas dendritas y axones que generalmente sirven de estructura comunicante con otras células mediante la sinapsis (Purves, 2004).

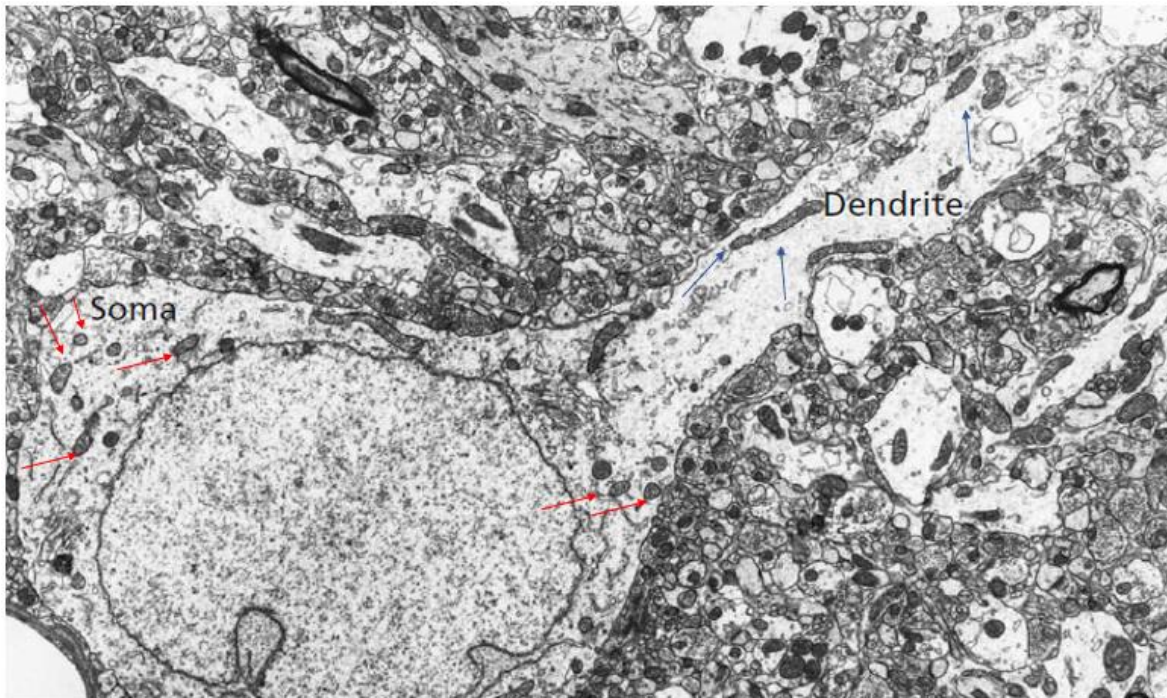


Fig 2.1.- Micrografía de una neurona. Se puede observar el soma con un gran núcleo de cara abierta (euromatina predominante, electrolúcida) y mitocondrias alrededor de dicho núcleo (flechas rojas). También se observa una dendrita, con mitocondrias más alargadas (flechas azules) con respecto a las somáticas. (Modificado de Pavelka & Roth, 2005).

Por otro lado, el grupo de la glía corresponde a aquellas células que participan en los procesos nerviosos, pero que no son capaces de generar un potencial de acción, aunque sí son excitables eléctricamente, además de que se encuentran estrechamente relacionadas con la función sináptica (Kettenmann & Ransom, 2013; Purves, 2004). No contienen un axón ni dendritas, aunque sí desarrollan prolongaciones gliales que permiten la comunicación con otras células mediante uniones estrechas (gap junctions) (Kettenmann & Ransom, 2013).

3. Mitocondrias del Núcleo Medio del Cuerpo Trapezoide (MNTB).

3.1 ¿Qué es el MNTB?

El Núcleo Medio del Cuerpo Trapezoide (MNTB, por sus siglas en inglés) forma parte de la vía auditiva como parte del Complejo Olivario Superior (SOC), localizado en el tallo cerebral a la altura del puente y cuyos núcleos sirven como relevos organizados por escala de frecuencias (tonotopía) provenientes de estructuras

previas (oído interno (cóclea), núcleo coclear) (Kuwabara & DiCaprio 1991; Masterton, 1967; Rees & Palmer, 2010).

El MNTB del ratón comienza su desarrollo aproximadamente en el día embrionario 15 (E15) y alcanza su organización tonotópica significativa entre los días P5 y P9 (Kim & Kandler, 2003), previo a la apertura del canal auditivo en P12. Esto sugiere que los procesos de maduración y diferenciación de la vía auditiva ocurre por un refinamiento sináptico que debe concluirse antes de que la vía sea usada (Kim & Kandler, 2003; Saliu et al., 2013). Además, se ha observado que la tasa de proliferación celular en el ratón es mayor alrededor del día P10, muy cercano a la edad de la apertura del canal auditivo y comparativamente mayor con respecto a edades menores (P0) e incluso posteriores (P15), cuando la audición ya es completamente funcional (Saliu et al., 2014).

El MNTB cumple una función inhibitoria hacia la Oliva Lateral Superior (LSO), con la finalidad de contribuir a la localización de los sonidos (Masterton, 1967). Recibe aferencias directas de las células en racimo de la zona ventral del núcleo coclear contralateral (VCN) de tipo excitatorio, hacia los somas de sus células principales formando una sinapsis axosomática muy particular, que en mamíferos se conoce como la sinapsis del Cáliz de Held (CoH) (Rees & Palmer, 2010; Schneggenburger & Forsythe, 2006). El soma de las células principales del MNTB contiene primordialmente receptores glutamatérgicos tipo AMPA (Borst et al., 1995); la zona terminal del axón envuelve al soma de una sola célula principal; en este contacto se pueden localizar múltiples zonas activas que permiten una alta eficacia en la transmisión de estímulos de altas frecuencias. (Borst et al., 1995; Rees & Palmer, 2010; Schneggenburger & Forsythe, 2006)

3.2 Mitocondrias en el MNTB.

La sinapsis del Cáliz de Held requiere de un alto costo energético para la eficiencia de la transmisión de altas frecuencias, siendo posible gracias a los llamados complejos adherentes asociados a mitocondrias (MAC), conformados por las mismas mitocondrias, complejos vesiculares y zonas de adherencia. En algunos núcleos del Complejo Olivar Superior se han encontrado terminales post sinápticas

con MACs, pero en particular las terminales axónicas hacia el MNTB contienen una mayor cantidad de ellos en sus zonas activas (Perkins, 2015; Rowland et al., 2000) (Figura 3.1).

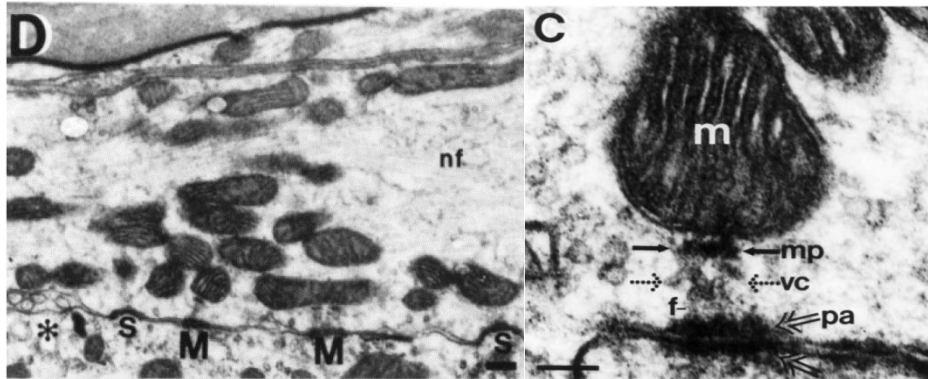


Fig 3.1. Mitochondrias en el Cáliz de Held y MACs. Izquierda: Se pueden observar numerosas mitocondrias cerca de los sitios activos sinápticos (s) y algunos MACs (M). Derecha: Acercamiento de un MAC, donde se puede apreciar a la mitocondria (m) con sus crestas perpendiculares a la membrana celular, una placa mitocondrial (mp), complejo vesicular (vc), filamentos (f) y la zona de contacto sináptico (puncta adherentia, pa). (Tomado de Rowland, 2000).

En el soma de la célula principal, se observa una gran densidad de mitocondrias alrededor del núcleo (Figura 3.2), varias de ellas fusionadas y sin una orientación aparente de las crestas en comparación con las MACs (Vater, 1995), que se encuentran en perpendicular a la membrana celular (Figura 3.2).

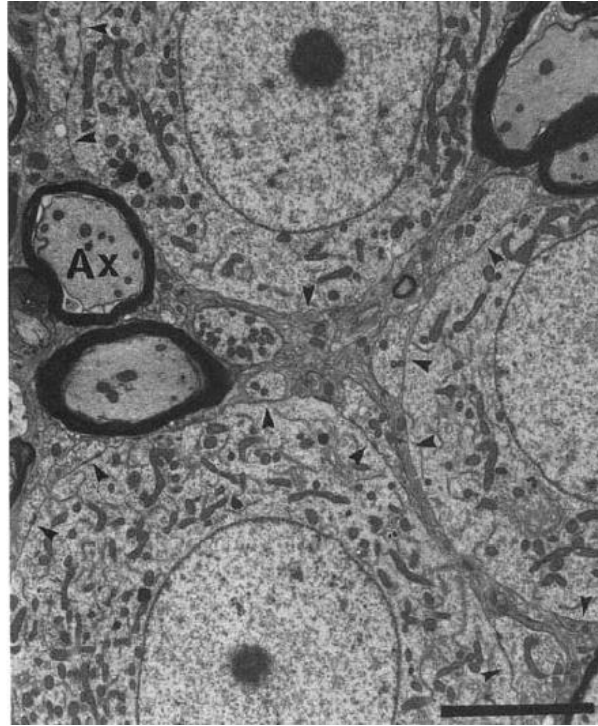


Fig. 3.2 Distribución de las mitocondrias en el soma de las células principales del MNTB. Se puede observar a las mitocondrias distribuidas uniformemente en el citoplasma de la célula, alrededor del núcleo. Resulta interesante observar que no se adosan tan cercanamente a los sitios activos en la post sinapsis (puntas de flecha), en comparación con la terminal del Cáliz de Held (Figura 5). (Tomada de Vater, 1995).

Justificación.

Los estudios previos (Vater, 1995; Perkins, 2015; Rowland, 2000) han descrito a la mitocondria del MNTB con una densidad amplia alrededor del núcleo neuronal, aunque también en la terminal del Cáliz de Held, siendo ello descrito en la edad adulta, posterior a la apertura del canal auditivo.

Sin embargo, no se ha descrito con precisión la distribución de la mitocondria en las neuronas previo a la apertura del canal, siendo que en las dos primeras semanas de vida de la rata se lleva a cabo el desarrollo plástico del MNTB.

Hipótesis.

La distribución de la densidad de la mitocondria no es homogénea en la célula principal del MNTB, previo a la apertura del canal auditivo.

Objetivos.

Principal.

Analizar la distribución de las mitocondrias de las Células Principales del MNTB previo a la apertura del canal auditivo de la rata (P9).

Particulares.

- i) Observar la distribución de la mitocondria en la célula con respecto al citoplasma.
- ii) Distinguir entre la distribución mitocondrial pre- y post- sináptica.
- iii) Describir los organelos asociados con la mitocondria en la pre- y post-sinapsis.

Material y método.

Los animales fueron proporcionados por el Departamento de Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velazco Suárez” (INNN), bajo condiciones ambientales controladas con agua y alimento *ad libitum*. El manejo se apega a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999 (“Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”).

Animales: Ratas Wistar, machos, de la edad P9 (postnatal 9).

Inmunofluorescencia:

Los animales se perfundieron vía intracardiaca con amortiguador salino de fosfatos (PBS, 0.1 M, pH 7.4) y solución de fijación (PBS 0.1 M + paraformaldehído 4%, pH 7.4).

Se obtuvieron los cerebros completos y se dejaron durante una noche en postfijación en la solución de fijación. Posteriormente se procedió a la crioprotección con sacarosa (PBS 0.1 M + 10% de sacarosa), depositando los cerebros en dicha solución hasta que se hundieran al fondo del frasco (aproximadamente 24 horas), cambiando a una solución al 30% de sacarosa con el mismo procedimiento.

Una vez pasado el tratamiento con sacarosa, los cerebros fueron embebidos en Tissue-Tek (Sakura® Finetek) para generar los bloques para corte en frío.

Se obtuvieron cortes de 30 μm en criostato a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ del tallo cerebral que contenían al MNTB, los cuales fueron almacenados en PBS 0.1 M a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para la realización de la inmunofluorescencia, los cortes fueron seleccionados y lavados en tres ocasiones (10 minutos cada una) con PBS 0.1 M, en agitador orbital a 60 rpm, temperatura ambiente.

Posteriormente se procedió a bloquear las uniones inespecíficas con albúmina (1:50) en PBS 0.1 M + Tritón x-100 (0.3%), durante una hora a temperatura ambiente.

Los tejidos se incubaron en el anticuerpo primario Anti-ATP5a Rabbit IgG (AbCam, 1:500) en PBS 0.1M + Tritón x-100 (0.3%), a 4°C durante 48 horas. Pasado ese tiempo, fueron lavados en tres ocasiones con PBS 0.1M, 10 minutos por ocasión.

Se procedió a incubar los tejidos en el anticuerpo secundario Anti-Rabbit IgG Alexa 568 [Santa Cruz Technologies, (1:1000)] en PBS 0.1M [poner excitación y emisión] durante 2 horas a temperatura ambiente. Al finalizar, se lavaron en cuatro ocasiones con PBS 0.1.

Los tejidos se montaron en portaobjetos de vidrio y se mantuvieron en medio de montaje para inmunofluorescencia Vectashield (Vector Labs) con DAPI (poner significado de DAPI) para teñir núcleos celulares.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM):

Los animales se perfundieron vía intracardiaca con amortiguador de fosfatos (PBS, 0.1 M, pH 7.4) y solución de fijación (PBS 0.1 M + glutaraldehído 2.5%, pH 7.4).

Posteriormente se realizó la disección del tallo cerebral, obteniendo bloques de 1 mm³ del MNTB, los cuales fueron colocados durante 90 minutos en frascos de vidrio que contenían la solución de fijación.

Se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con el amortiguador de fosfatos para proceder a la post fijación y primer contraste con tetraóxido de osmio en solución acuosa al 1% (OsO₄) durante 1 hora.

Los bloques fueron nuevamente lavados en tres ocasiones con el amortiguador de fosfatos, para proceder a su deshidratación mediante un gradiente creciente de etanol (70%, 80% y 90%), en una ocasión por 10 minutos cada uno. Se realizó una última deshidratación con etanol absoluto (100%), tres veces a 5 minutos cada una.

En seguida, las muestras se trataron con óxido de propileno como intermediario previo a la inclusión, en dos ocasiones de 10 minutos cada una.

Después, los bloques fueron puestos en mezcla de pre inclusión, que contenía una proporción 1:1 de óxido de propileno y la mezcla propia de inclusión (Epon 812 [4.3 ml], DDSA [4.3 ml], NMA [1.96 ml], DMP [0.33 ml] – Total, 10.89 ml), durante 24 horas.

Las muestras fueron incluidas en resina epóxica (mezcla de inclusión) durante 48 horas a 60°C para su polimerización, obteniendo bloques para su corte en ultramicrotomo.

Se obtuvieron cortes semifinos (250 – 300 nm), depositándolos en portaobjetos de vidrio, que se tiñieron con azul de toluidina para su observación en microscopio de luz, así como para delimitar la zona de corte para microscopía electrónica.

Una vez delimitada la zona de interés, se obtuvieron cortes ultrafinos (60 – 90 nm), los cuales se montaron en rejillas de cobre de 200 mesh, que posteriormente fueron contrastados con acetato de uranilo al 4% durante 20 minutos (cámara húmeda) y con citrato de plomo al 1% durante 10 minutos (cámara húmeda y lentes de hidróxido de sodio).

Las rejillas contrastadas se observaron al microscopio electrónico y se obtuvieron micrografías en formato TIFF de las células principales del MNTB a diferentes aumentos.

Análisis de datos.

Las micrografías se cargaron al programa ZEN (Carl Zeiss, 2014) para ajustar el brillo y contraste y describir la forma, ubicación y cercanía de la mitocondria con otros organelos.

RESULTADOS

Distribución del marcaje mitocondrial en inmunofluorescencia del MNTB.

Se observa primordialmente la expresión de ATP5a en zonas citoplasmáticas alrededor del núcleo de las células, siendo que, si bien no se utilizaron anticuerpos específicos contra algún tipo celular en particular, podemos distinguir la morfología redondeada de las células principales y algunas otras células que probablemente pertenezcan a la población glial (Fig R1).

Lo anterior se confirma cuando conjugamos el canal del marcaje mitocondrial con el perteneciente a DAPI, podemos observar con mayor claridad la distribución previamente descrita con respecto al núcleo celular.

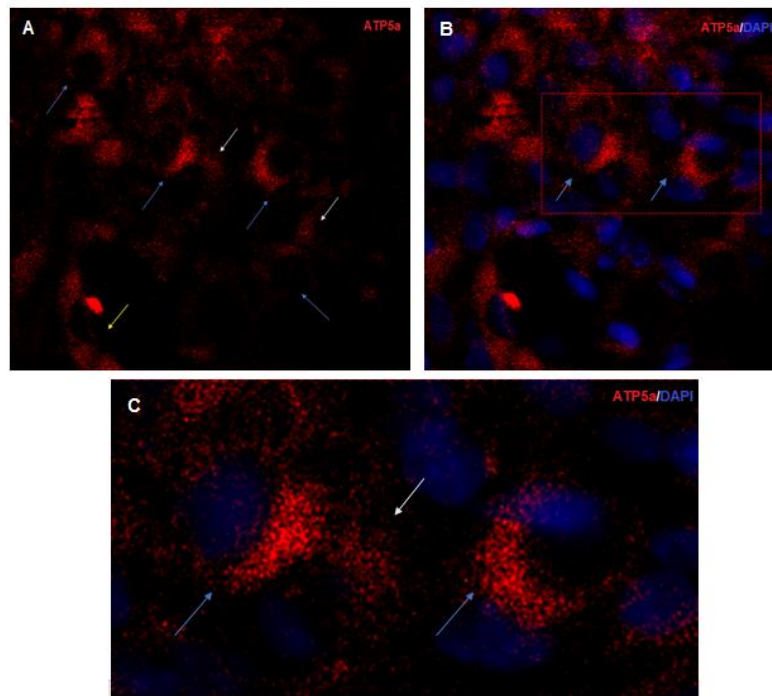


Fig. R1.- Expresión de ATP5a en el MNTB por inmunofluorescencia. A) Observamos la amplia distribución de la mitocondria, sobre todo en el soma celular, pudiendo distinguir células con morfología característica de las principales del MNTB (flechas azules) y prolongaciones (flechas blancas), además de algunas células alargadas (flecha amarilla). B), C) La distribución de la mitocondria se presenta de manera amplia alrededor del núcleo celular, donde podemos apreciar con mayor detalle dicha distribución en el cuadro C) (ampliación del cuadro rojo en B)), donde el patrón de puntilleo se distribuye uniformemente en el soma de la célula principal.

Observación de células principales del MNTB en cortes semi finos.

Se obtuvieron cortes semi finos de aproximadamente 300 nm, cuya coloración en la barquilla de corte era azul – rosa, distintiva de dicho grosor.

A su observación al microscopio fotónico, podemos notar varias células con un núcleo de cara abierta y en algunas se pueden distinguir muy claramente el nucléolo (Fig. R2). Además, podemos observar ligeramente los cuerpos de Nissl en células con un soma redondeado, característico de neuronas y más específicamente con la morfología de las Células Principales del MNTB (Fig. R2).

También es de notar que existen pocos axones mielínicos, aunque existe presencia de oligodendrocitos, o de otros tipos de célula glial, como los astrocitos.

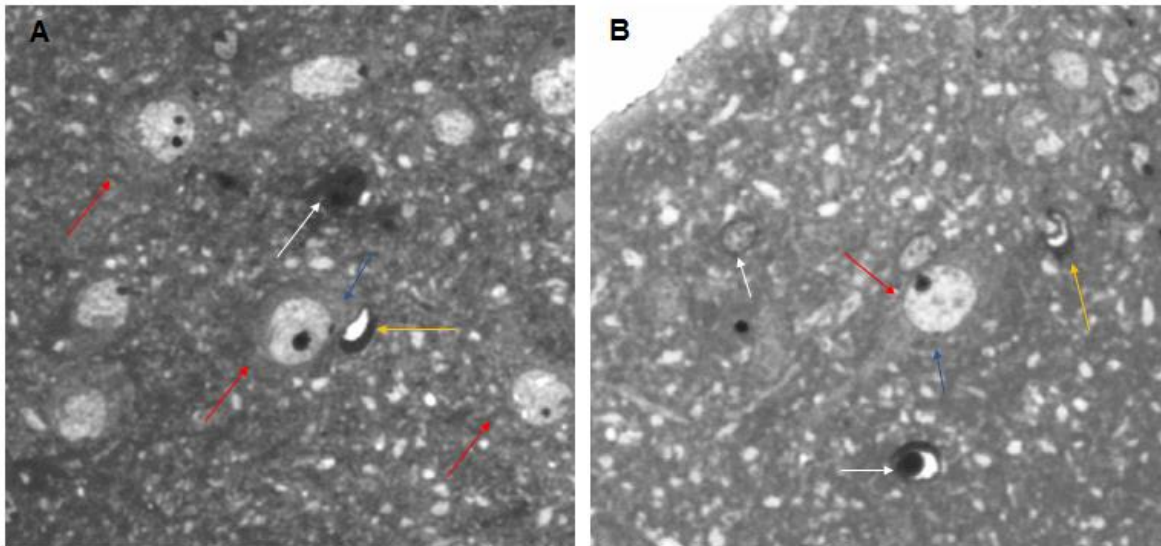


Fig. 2.- Observación de cortes semifinos del MNTB. En ambas figuras logramos observar a las células principales del MNTB, características por núcleos de cara abierta y somas redondeados de gran tamaño (flechas rojas), donde en algunos se pueden apreciar los Cuerpos de Nissl (flechas azules), propios de ribosomas libres. A su vez se logran distinguir algunos otros tipos celulares por sus núcleos más compactos y de menor tamaño (flechas blancas), así como unos cuantos axones mielínicos (flechas amarillas). (Azul de toluidina; imagen monocromática).

Por tanto, en la primera aproximación hacia la preparación de cortes para el microscopio de transmisión, logramos obtener la región de interés, gracias a la identificación de las células principales del MNTB.

Microscopía Electrónica de Transmisión del MNTB

Se obtuvieron cortes ultrafinos de entre 60 y 90 nm de grosor (coloración de plateado a gris en la barquilla de corte), que fueron montados para la observación al TEM.

En bajos aumentos (Fig. R3), podemos confirmar la morfología de las Células Principales del MNTB, al observar aquellos núcleos de cara abierta que se describieron en los cortes semi finos, además de la morfología redondeada característica de las neuronas de dicha región.

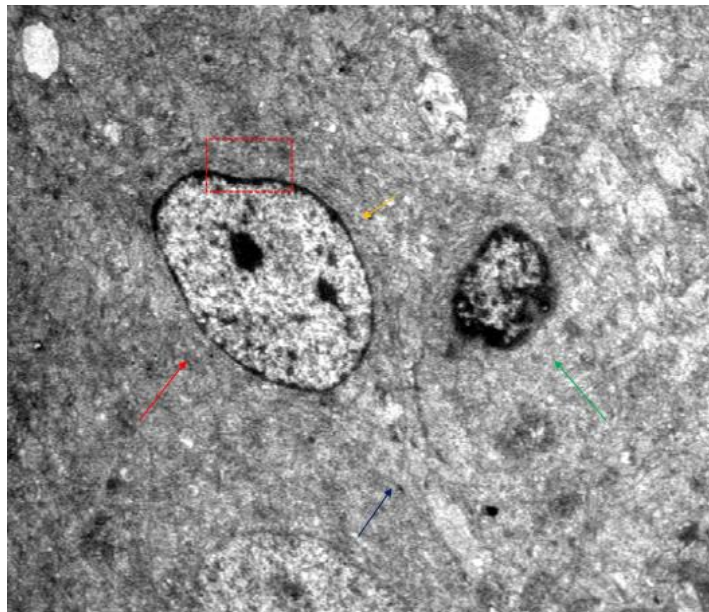


Fig. R3.- Micrografía electrónica de células del MNTB. Podemos observar a una célula principal (flecha roja), donde se observa su morfología redondeada, el gran núcleo de cara abierta y un axón de surge de dicha célula (flecha azul), además de que se pueden notar los Cuerpos de Nissl (flecha amarilla). A su vez, se encuentra muy cercana una célula de menor tamaño (flecha verde), con un núcleo más compacto y sin cuerpos de Nissl, lo que apunta a que se trata de una célula glial.

Con el fin de hacer una descripción general de las mitocondrias, utilizamos aumentos cada vez mayores, por lo que logramos observar que dicho organelo se encuentra ampliamente distribuido alrededor del núcleo celular, cercano a retículo endoplásmico rugoso y con ribosomas circundantes (Fig. R4). Haciendo una medición aproximada en Unidades Arbitrarias de Área (UA^2), las mitocondrias comprenden cerca del 25% ($5 UA^2$) del área propia del citoplasma (que no incluye al núcleo = $20 UA^2$). Sin embargo, si consideramos al área total de la célula

(incluyendo al núcleo = 72 UA²), dicha proporción de la mitocondria disminuye al 4.1%, mientras que el núcleo en sí constituye cerca del 72.2% del área total de la célula (52 UA²). A su vez, el núcleo tiene una proporción 1:10 en área con respecto a la mitocondria.

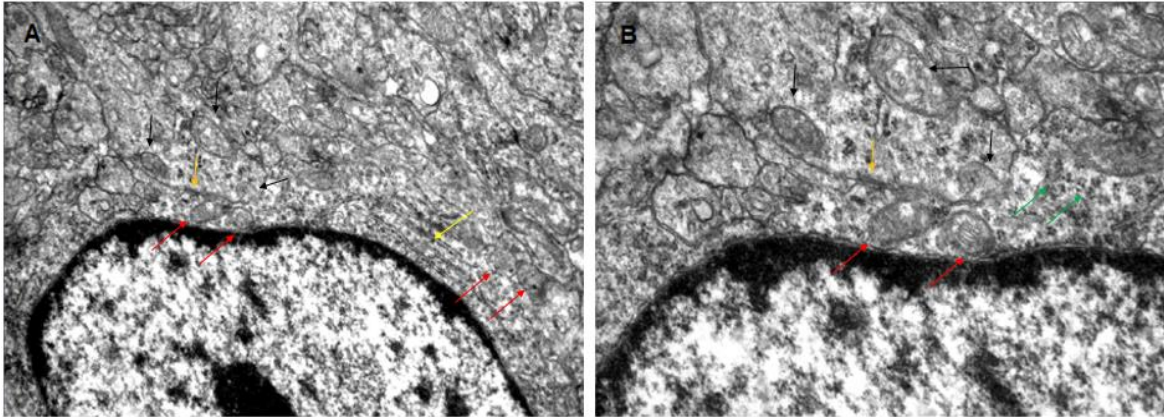


Fig. R4.- Acercamiento a la célula principal de la figura R3 (recuadro rojo). Observamos algunas mitocondrias en el soma de la neurona (flechas rojas) y algunas otras pertenecientes a la terminal pre sináptica (flechas negras). Las mitocondrias que se encuentran en el soma de la neurona principal están cercanas al núcleo celular, a ribosomas libres (Cuerpos de Nissl, flechas verdes en B) y a retículo endoplásmico rugoso (flecha amarilla en A)), mientras que las mitocondrias pre sinápticas son circundantes a las zonas activas (flechas naranja).

Se pueden apreciar claramente los componentes gruesos de la mitocondria, donde en un acercamiento mayor podemos apreciar tanto la membrana externa, la membrana interna, las crestas (tanto en un sentido longitudinal como transversal) y la matriz mitocondrial (Fig. R5). A semejan en densidad de crestas a las reportadas previamente en otras regiones cerebrales cercanas al MNTB, tales como el Colículo Inferior (Palade, 1953), donde las neuronas suelen presentar mayor cantidad de crestas con respecto a las células gliales (Fig. 5, B y D).

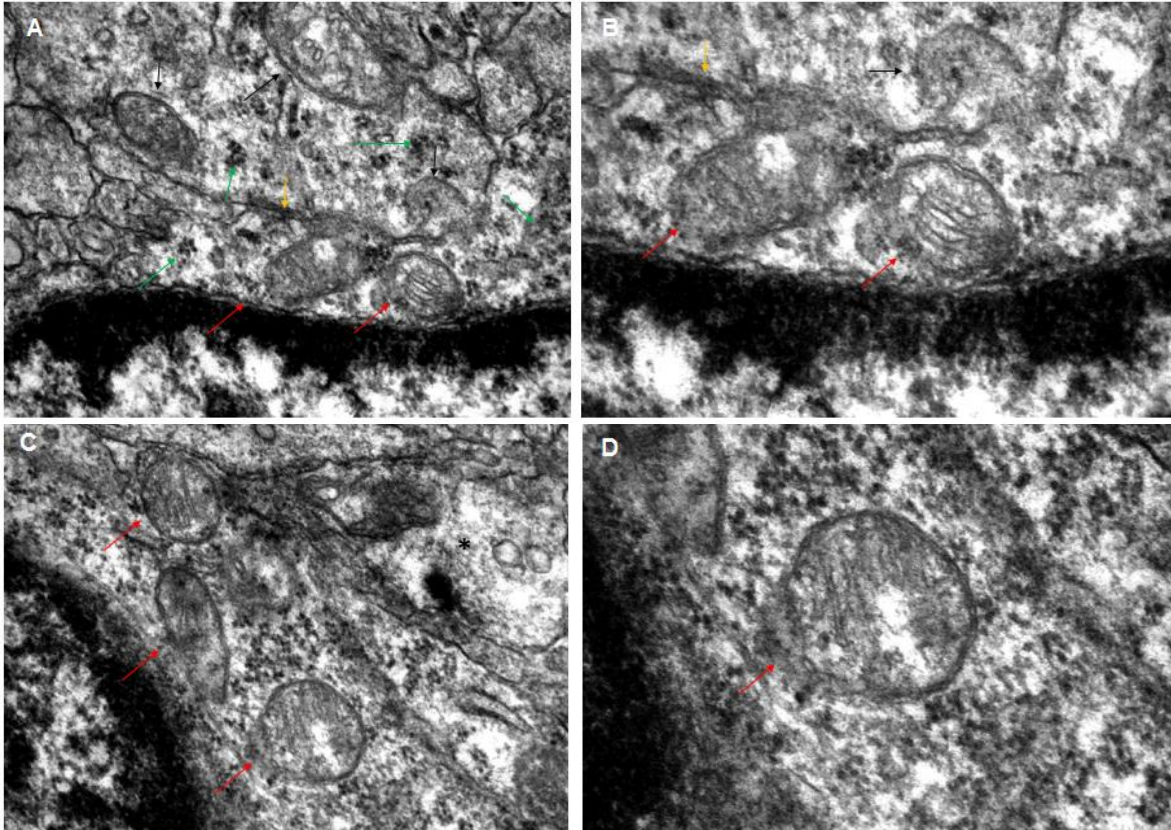


Fig. R5.- Comparación entre mitocondrias neuronales y gliales. Paneles A y B: podemos observar a las mitocondrias de una célula principal del MNTB y una terminal sináptica inervando el soma. Las mitocondrias presentan una matriz mitocondrial ligeramente electrodensa, con menor espacio entre crestas con respecto a las mitocondrias gliales. Se les observa cercanas a los sitios activos (flecha naranja) y con una forma preferentemente alargada. Paneles C y D: mitocondrias en una célula glial. Se observa que dichas mitocondrias tienen una forma más redondeada, su matriz es más electrolúcida con respecto a las neuronales y también existe un mayor espacio entre crestas. Se encuentran ribosomas libres alrededor de las mismas.

DISCUSIÓN

El presente trabajo ha permitido iniciar una exploración puntual a las mitocondrias de las células del Núcleo Medio del Cuerpo Trapezoide (MNTB), que pertenece a la vasta cantidad de núcleos que conforman a la vía auditiva.

Estudios previos en ultraestructura dirigidos al MNTB habían hecho una descripción general de las células principales, siendo que en cuanto a las mitocondrias dichos estudios se centraban en la descripción de las mismas en las terminales del Cáliz de Held una vez que se había alcanzado la maduración del circuito (Borst & Rusu, 2012), en donde las mitocondrias se encuentran muy cercanas a las terminales sinápticas, asociadas a otros componentes de la célula tales como microtúbulos, vesículas y complejos adherentes (Rowland, 2000).

En cuanto a la distribución mitocondrial en el soma de las células principales del MNTB, los estudios no se han centrado en particular a dicho organelo (Perkins et al, 2010; Rowland et al, 2000), sin embargo, han servido fielmente para identificar ultraestructuralmente al MNTB, pues podemos verificar la morfología propia de las neuronas de esta región, lo cual logramos abordar desde tres técnicas distintas, pudiendo obtener información general sobre la distribución de las mitocondrias.

Primero, el ensayo con inmunofluorescencia nos brindó un panorama general de la distribución de la mitocondria en el MNTB, pudiendo observar que la misma tiene una distribución preferente y homogénea en el soma de la neurona, circundante al núcleo celular, además de que dicha uniformidad nos permitió identificar a las células principales sin necesidad de realizar una inmuno-detección con algún anticuerpo específico para las mismas, pues la morfología redondeada de dichas células se hizo evidente.

Dicha morfología se evidenció aún más con el análisis de los cortes semi-finos obtenidos al ultramicrotomo, en donde la tinción con Azul de Toluidina logró mostrar al característico núcleo de cara abierta que poseen las neuronas, adicional al gran tamaño de las células principales y la presencia de cuerpos de Nissl, además de una presencia mínima de axones mielinizados, pues no se esperaba una gran

cantidad de los mismos, dado que la proliferación de oligodendrocitos (células gliales encargadas de la producción de vaina de mielina) inicia en el día postnatal 8 en el MNTB de la rata (Kim & Kandler, 2003), siendo que en el presente trabajo se utilizaron ratas con edad postnatal 9.

Aunado a la edad, también existe el hecho de que dentro de las primeras dos semanas de vida de la rata la terminal del Cáliz de Held sigue en maduración, iniciando en el día P2 y finalizando cerca del día P14 (Borst & Rusu, 2012; Hoffpauir et al, 2006). En este trabajo no se logró identificar un cáliz totalmente desarrollado, sin embargo, se lograron identificar terminales axónicas que contactan directamente al soma de la neurona (Fig. R4), tal como se esperaría encontrar en la clásica sinapsis axosomática que presenta el MNTB, por lo que podemos especular que, dada la edad de análisis, los cálices siguen en crecimiento en aras de esperar la apertura del canal auditivo, que en la rata se presenta en el día postnatal 13 (Borst & Rusu, 2010; Saliu et al, 2014).

Sin embargo, las mitocondrias se encuentran en dicha terminal axónica coadyuvando a la transmisión sináptica existente en la región, muy cercanas al sitio activo, tanto en la pre como en la post sinapsis, que si bien no existe transmisión de información de los estímulos del exterior dado que el canal auditivo aún no está disponible, está bien reportado que la actividad espontánea de toda la vía se presenta desde temprano en la vida de la rata, siendo que desde el día P2 existen registros espontáneos desde la cóclea hasta el Complejo Olivar Superior al que pertenece el MNTB (Schneppenburger & Forsythe, 2006), en donde en la transmisión de los impulsos la mitocondria participa activamente en la disponibilidad del calcio y el soporte energético para eventos como el acoplamiento de vesículas a la membrana celular o el mantenimiento homeostático del medio por medio de bombas iónicas (Purves, 2004), por lo que tiene mucho sentido que las mitocondrias se distribuyan ampliamente en el citoplasma desde etapas tempranas.

Por último, logramos tener una aproximación a las diferencias entre células neuronales y células gliales en cuanto a sus mitocondrias. Se ha reportado que las primeras tienen una actividad oxidativa mayor que el grupo glial (Kettenmann &

Ransom, 2013), lo cual se ha tratado de correlacionar con la morfología mitocondrial, siendo que si éste organelo posee una cantidad menor de crestas y una matriz mitocondrial más abierta y electrolúcida, su actividad oxidativa será menor (Liesa et al, 2009; Kettenmann & Ransom, 2013; Vázquez-Memije et al, 2002). Como pudimos observar, las mitocondrias de la célula glial poseen menos crestas y su matriz es menos densa con respecto a las neuronales. En común, ambos grupos celulares comparten el hecho de que las mitocondrias se encuentran muy cercanas al núcleo celular y con ribosomas circundantes, por lo que la participación de la mitocondria sigue siendo relevante en procesos como la síntesis de proteínas.

En conclusión, el presente trabajo ha servido para comparar distintas aproximaciones al estudio de un organelo en particular, siendo la mitocondria el objetivo propio. La predicción hecha desde los ensayos de inmunofluorescencia nos ha permitido dirigir nuestra atención al soma de la célula en búsqueda de las mitocondrias, siendo que el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) tiene la cualidad de darnos información a detalle de la verdadera distribución del organelo en la célula y la relación que guarda con otros más, así como con la función propia del grupo celular de interés, por lo que resulta una herramienta sumamente poderosa para ampliar los conocimientos existentes en la Biología Celular y complementarlos con otras técnicas existentes en campo.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. La distribución de la mitocondria es relativamente amplia con respecto al citoplasma propio de la célula.
2. Existe una relación estrecha entre la distribución de la mitocondria y el núcleo celular, pues se le encuentra circundante al mismo.
3. La mitocondria es cercana a las zonas activas, tanto en la pre como en la post sinapsis.
4. Podemos observar diferencias cualitativas en la morfología mitocondrial entre células neuronales y gliales, lo cual puede hablar de sus funciones y actividad metabólica.
5. Los diferentes tipos de microscopía nos pueden brindar información variada y complementaria, por lo que los estudios basados en ellas se tornan integrales.
6. El presente estudio servirá como precedente para conocer la preparación de material en el MNTB y llevar los hallazgos hacia la descripción en un modelo de lesión auditiva, por lo que el TEM resultará como una herramienta indispensable para dicho propósito.

Referencias

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the cell* (Sexta ed.). Nueva York: Garland Science.
- Borst, J., & Rusu, S. (2012). The Calyx of Held Synapse. Synaptic Mechanism in the Auditory System. *Science*, 95-134.
- Bozzola, J., & Russell, L. (1992). *Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists*. (Segunda ed.). Canadá: Jones and Bartlett Publishers.
- Hoffpauir, B., Grimes, J., Mathers, P., & Spirou, G. (2006). Synaptogenesis of the Calyx of Held: Rapid onset on function one-to-one morphological innervation. *The Journal of Neuroscience*, 26(20), 5511-5523.
- Hoitzing, H., Johnston, I., & Johnes, N. (2015). What is the function of mitochondrial networks? A theoretical assessment of hypotheses and proposal for future research. *Bioessays*(37), 697-700.
- Kettenmann, H., & Ransom, B. (2013). *Neuroglia* (Tercera ed.). NY, USA: Oxford University Press.
- Kim, G., & Kandler, K. (2003). Elimination and strengthening of glycinergic/GABAergic connections during tonotopic map formation. *Nature*, 6, 282-290.
- Kuwabara, N., DiCaprio, R., & Zook, J. (1991). Afferents to the Medial Nucleus of Trapezoid Body and Their Collateral Projections. *The Journal of Comparative Neurology*(314), 684-706.
- Liesa, M., Palacín, M., & Zorzano, A. (2009). Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease. *Physiology Reviews*(89), 799-845.
- Masterton, B., Jane, J., & Diamond, I. (1967). Role of brainstem auditory structures in sound localization. I. Trapezoid Body, Superior Olive and Lateral Lemniscus. *Journal of Neuropsychology*, 30(2), 341-359.
- Palade, G. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *Journal of Histochemistry and Citochemistry*, 1(4), 188-211.
- Pavelka, M., & Roth, J. (2005). *Functional Ultrastructure. An atlas of tissue Biology and Pathology*. Australia: Springer-Verlag.
- Perkins, G., Tjong, J., Brown, J., Poquiz, P., Scott, R., Kolson, D., . . . Spirou, G. (2010). The Micro-Architecture of Mitochondria at Active Zones: Electron Tomography Reveals Novel Anchoring Scaffolds and Critical Structure for High-Rate Metabolism. *The Journal of Neuroscience*, 1015-1026.
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A.-S., McNamara, J., & Williams, M. (2004). *Neuroscience* (Tercera ed.). MA, USA: Sinauer Associates.
- Rees, A., & Palmer, A. (2010). *The Oxford Handbook of Auditory Sciences. The Auditory Brain*. USA: Oxford University Press.

- Rowland, K., Irby, N., & Spirou, G. (2000). Specialized synapse-Associated Structures within the Calix of Held. *The Journal of Neuroscience*, 20(24), 9135-9144.
- Saliu, A., Adise, S., Xian, S., Kudelska, K., & Rodríguez-Contreras, A. (2014). Natural and Lesion-Induced Decrease in Cell Proliferation in the Medial Nucleus of Trapezoid Body. *The Journal of Comparative Neurology*, 522, 971-985.
- Scheffler, I. (2008). *Mitochondria*. New Jersey, USA: Wiley.
- Schneggenburger, R., & Forsythe, I. (2006). The Calix of Held. *Cell*(326), 311-337.
- Vázquez Memije, M. E., & Tuena de Gómez, M. (2002). *Mitochondria*. DF, México: Prado.