

5/16

T.D
I/16

R. 33577

R. 33595

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
NEGOCIADO DE TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al
folio 92 número 26 del libro
correspondiente.

Sevilla, 8 JUN. 2001

El Jefe del Negociado

**"EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA MELATONINA
SOBRE EL DESARROLLO NEUROGLIAL DE LA RETINA
EN EMBRIONES DE POLLO TRATADOS CON**

GLUTAMATO"

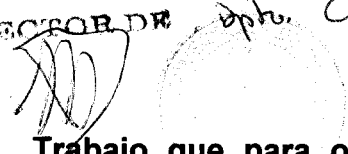
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en Dpto. Ciencias Morfológicas
de la Facultad de Medicina
de esta Universidad desde el día 13/06/2001
hasta el día 5/07/2001

Sevilla 13 de Junio
de 2001

EL DIRECTOR DE

Dpto. Ciencias Morfológicas



Trabajo que para optar al grado de Doctor en Medicina y

Cirugía presenta la Licenciada Dña. Eva María Isorna Peláez.

Sevilla, 2001

**“EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA MELATONINA
SOBRE EL DESARROLLO NEUROGLIAL DE LA RETINA
EN EMBRIONES DE POLLO TRATADOS CON
GLUTAMATO”**

Trabajo presentado por la Licenciada Dña. Eva María Isorna Peláez para optar al grado de Doctor por el Programa del Doctorado “*Perspectivas en Morfología*” del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Sevilla.



Fdo.: Eva María Isorna Peláez.



Fdo.: Juan Jiménez-Castellanos Ballesteros

Catedrático de Universidad y

Director del Departamento de

Ciencias Morfológicas de la

Universidad de Sevilla.

D. FRANCISCO ANDRÉS PRADA ELENA, CATEDRÁTICO DE
UNIVERSIDAD Y DÑA. M^a. AUXILIADORA ESPINAR GARCÍA,
PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS MORFOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CERTIFICAN: Que el trabajo titulado "*Efecto neuroprotector de la melatonina sobre el desarrollo neurglial de la retina en embriones de pollo tratados con glutamato*", ha sido realizado en el Instituto de Biología del Desarrollo y en el Departamento de Ciencias Morfológicas bajo nuestra dirección.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, lo firman en Sevilla a veintiocho de Mayo de dos mil uno.

Fw, 2 Cory
Fw 12 Cory

H. Espinar

Quisiera expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a los Profesores Doctores D. Francisco A. Prada Elena y Dña. M^a Auxiliadora Espinar García, directores de esta Tesis Doctoral, sin cuya tutela científica, entusiasmo y colaboración, este trabajo jamás hubiera visto alcanzado los objetivos marcados al inicio de su realización.

Mi agradecimiento a la Profesora Doctora Dña. Adela Quesada Ruiz, por la colaboración que siempre me ha ofrecido.

Mi gratitud a D. Alejandro García de la Oliva y a Dña. María del Mar Guerrero León, compañeros del doctorado, que siempre estuvieron dispuestos a colaborar cuando más se les necesitaba.

Mi reconocimiento a Dña. Carmen Guzmán Morgaz y Dña. Inmaculada Polo Vargas de Machuca, por la ayuda prestada y la paciencia que nunca les faltó, cuando dábamos nuestros primeros pasos por los laboratorios.

Mi reconocimiento a Dña. Ana Mosquero Soriano, por su inestimable ayuda en la realización de la iconografía que ilustra esta Tesis Doctoral.

Mi reconocimiento a Dña. Natalia Gómez Rodríguez y Dña. Natividad Bordallo Oliva, por sus constantes esfuerzos en la gestión administrativa de esta Tesis Doctoral

" La ciencia de hoy no tiene ningún derecho a hipotecar la investigación del futuro"

D. Santiago Ramón y Cajal.

A mis padres.

A mi hermana.

A mi familia.

INDICE

1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	12
2.1. Organización estructural de la retina	13
2.1.1. La glia de la retina	16
2.2. Glutamato	19
2.2.1. Síntesis y liberación de glutamato	21
2.2.2. Receptores	22
2.2.3. Glutamato y excitotoxicidad	25
2.3. Melatonina	27
2.3.1. Síntesis y liberación de melatonina	27
2.3.2 Melatonina y Neuroprotección	30
3. PLANTEAMIENTO y JUSTIFICACIÓN	33
4. MATERIAL y METODOS	38
4.1. Procedimiento experimental	39
4.2. Preparación del material para microscopía lumínica	42
4.2.1. Método de Golgi Stensaas	42
4.2.2. Método de Golgi Colonier	43
4.3. Preparación del material para microscopía electrónica de transmisión	44
4.4. Preparación del material para inmunohistoquímica	46
5. RESULTADOS	49
5.1. Resultados de Microscopía óptica	50
5.2. Resultados de microscopia electrónica	59
6. ICONOGRAFIA	69

7. DISCUSION	99
8. CONCLUSIONES	114
9. BIBLIOGRAFIA	119

1. RESUMEN

En el presente estudio, analizamos con técnicas de microscopia lumínica y electrónica de transmisión, el efecto neuroprotector que induce la melatonina sobre la excitotoxicidad causada por la inyección de glutamato monosódico, cuando este es administrado en estadios precoces de la diferenciación neuroglial de la retina.

En su realización hemos utilizado embriones de pollo de la raza Ross-1, divididos en varias tandas control y experimentales en las que los embriones fueron inyectados, intra vitelo, a los 2 (E-2) y 6 (E-6) días de incubación para ser sacrificados entre los 8 (E-8) y 20 (E-20) días de desarrollo, según las siguientes pausas y dosis:

- * Embriones control (Grupo C): inyectados con 100µl de vehículo diluctor (n= 86).
- * Embriones inyectados con melatonina (Grupo M): 100µl de melatonina 4mM (n= 36).
- * Embriones inyectados con glutamato (Grupo G): 100µl de glutamato monosódico 1mM (n=66).
- * Embriones inyectados con D,L-alfa aminoacético (Grupo AAA): 200 µg de AAA 1mM (n= 20).
- * Embriones inyectados con melatonina y glutamato (Grupo MG): 100 µl de melatonina 4mM inyectado ½ hora antes de la administración de 100 µl de glutamato monosódico 1mM (n=36).

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la administración de glutamato actúa sobre la retina en diferenciación, provocando cambios degenerativos que afectan al desarrollo celular tanto de estirpes de naturaleza neuronal como glial. Así, durante los estadios iniciales de la diferenciación (E-13), las lesiones aparecen en la mitad vitrea de la capa nuclear interna, afectando a las células amacrinas y a las células de Müller. A medida que avanza el desarrollo (E-20), es a nivel de la capa de células ganglionares y, fundamentalmente en la capa de fibras del nervio óptico, donde las lesiones inducidas por la administración de glutamato, se manifiestan con mayor intensidad. Dichas alteraciones no se manifiestan en las retinas de los embriones a los que únicamente se les administró melatonina, y se encuentran muy atenuadas, en aquellos a los que se les administró melatonina, previamente a la inyección de glutamato.

Nuestras aportaciones confirman el papel neuroprotector de la melatonina, ante la excitotoxicidad glutamatérgica, y su inocuidad sobre los procesos de diferenciación del sistema nervioso central; contribuyendo a sentar las bases sobre las cuales, en un futuro, pueda ser considerada como un agente farmacológico eficaz en el tratamiento de ciertas enfermedades neurodegenerativas.

2. INTRODUCCION

2.1. ORGANIZACION ESTRUCTURAL DE LA RETINA

La retina de los vertebrados es una fina lámina de tejido nervioso situada en el fondo del ojo. Su función consiste en recibir las señales luminosas y transformarlas en una serie de impulsos nerviosos que son enviados al cerebro a través del nervio óptico.

La retina es una parte del SNC, que se desarrolla a partir de una porción del prosencéfalo y que posteriormente se diferencia en el diencéfalo embrionario. En la parte anterior ventral de esta porción del SNC y a cada lado de la línea media, se produce una evaginación que da origen a la vesícula óptica. A su vez, del neuroepitelio de la vesícula óptica surge una invaginación secundaria, con lo que la vesícula óptica se transforma en la copa óptica, que queda unida al resto del cerebro por el tallo óptico y posteriormente por el nervio óptico (Rodiek, 1973). Entre las dos paredes de la copa óptica queda el ventrículo, que es un espacio continuo con los ventrículos del cerebro. Posteriormente, este espacio se colapsa y se convierte en un espacio virtual.

El epitelio interno de la copa óptica constituye el neuroepitelio de la retina, del que se formará la retina neural adulta, auténtico tejido nervioso formado por seis clases de neuronas y por células de glía. El epitelio externo permanece con una sola capa de células y va a constituir el epitelio pigmentario de la retina, el cual no se diferencia como tejido nervioso, sino que queda como un epitelio de células de forma poligonal con abundantes invaginaciones en su cara externa y numerosas y largas prolongaciones en

su cara interna, la cual contacta con la retina neural.

Gran parte de los conocimientos que hoy tenemos sobre la estructura de la retina lo debemos a los trabajos de Ramón y Cajal (1892), realizados en un buen número de especies de vertebrados. Ramón y Cajal descubrió y estudió todas las clases de neuronas de la retina menos las células interplexiformes, así como los dos tipos de células gliales, los astrocitos y las células de Müller. En la retina de algunas especies como el pollo, el único tipo de glía descrito es la célula de Müller.

En la retina neural se distinguen seis capas, formadas éstas por los somas de las células y sus prolongaciones. Los somas celulares están dispuestos en tres capas nucleares, mientras que las prolongaciones forman las dos capas plexiformes y la capa de fibras del nervio óptico. Estas seis capas clásicamente descritas se recogen en la Lámina I

1.- **Capa nuclear externa (CNE).** En ella se sitúan, los somas de los fotorreceptores

2.- **Capa plexiforme externa (CPE).** Es una capa de contactos sinápticos entre las prolongaciones internas de los fotorreceptores y las prolongaciones de las células horizontales, bipolares e interplexiformes

3.- **Capa nuclear interna (CNI).** En ella se encuentran los somas de las células horizontales, bipolares, amacrinas, interplexiformes y ganglionares desplazadas, así como los de las células de Müller. Las células horizontales se sitúan formando la fila más externa de los somas. Los 2/3 más externos de esta capa los ocupan los somas de las células

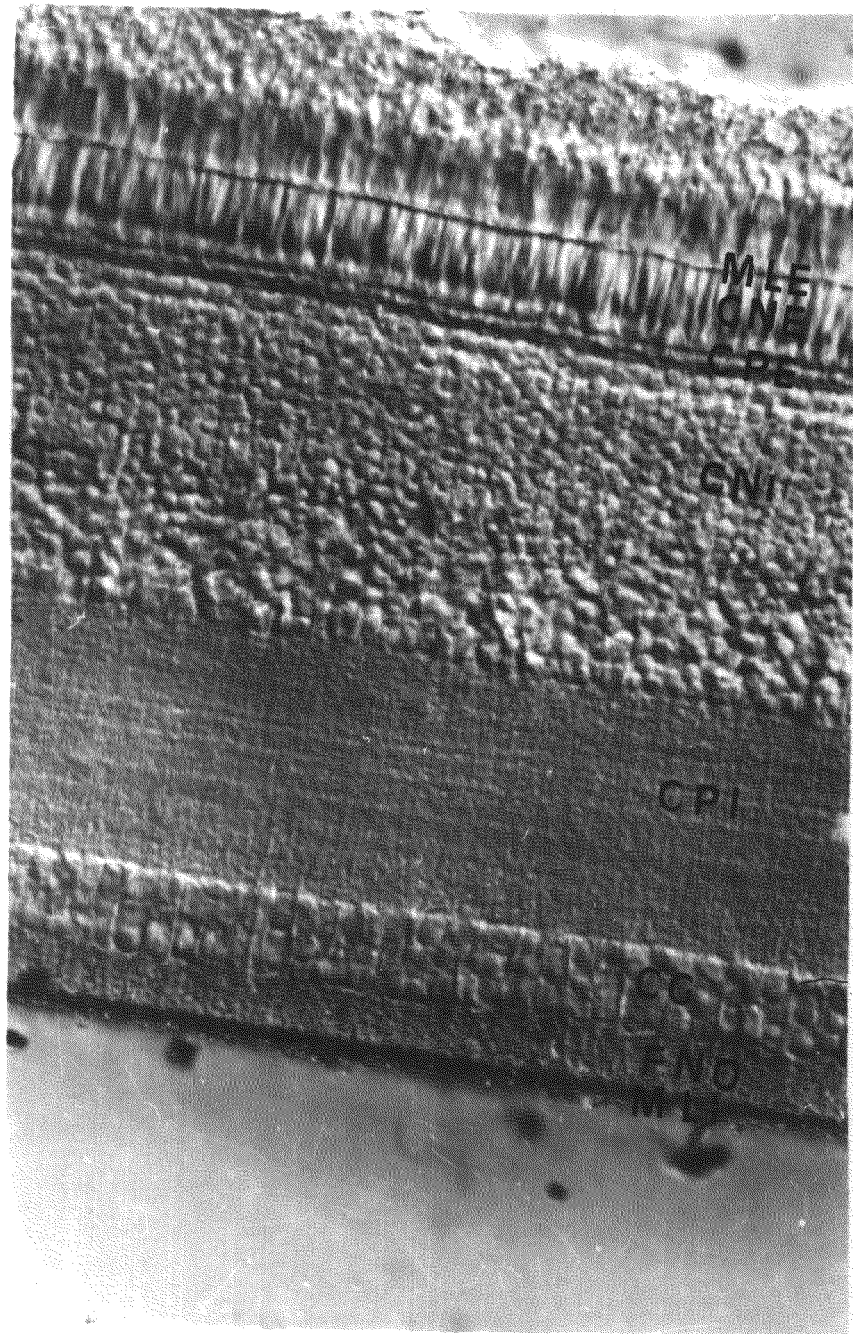


Lámina I:

Sección vertical de retina de pollo. **M.L.E.:** Membrana limitante externa. **C.N.E.:** Capa nuclear externa. **C.P.E.:** Capa plexiforme externa. **C.N.I.:** Capa nuclear interna. **C.P.I.:** Capa plexiforme interna. **C.G.:** Capa de células ganglionares. **C.F.N.O.:** Capa de fibras del nervio óptico. Técnica de Nomarski.

bipolares y de Müller, mientras que las células amacrinas, interplexiforme y ganglionares desplazadas se sitúan en el tercio más interno.

4.- **Capa plexiforme interna (CPI).** En ella sinaptan las células bipolares, amacrinas, ganglionares desplazadas e interplexiformes por un lado y las células ganglionares y amacrinas invertidas por otro.

5.- **Capa de células ganglionares (CCG).** Está formada por los somas de las células ganglionares y los de las células amacrinas invertidas

6.- **Capa de fibras del nervio óptico (CFNO).** Está formada por los axones de todas las células ganglionares y ganglionares desplazadas. Estos están orientados hacia la salida del nervio óptico y su grosor aumenta desde la retina periférica hacia la zona papilar.

En la retina neural se distinguen dos membranas limitantes, la externa y la interna. La **membrana limitante externa (MLE)** está formada por uniones especializadas o uniones adherentes, entre los segmentos internos de los fotorreceptores, las mazas de Landolt de las células bipolares y las prolongaciones externas de las células de Müller. Entre la MLE y el epitelio pigmentario se observa una capa clara al microscopio óptico, la **capa de conos y bastones (CCB)**, también llamada **espacio subretinal (ES)**, formada por los segmentos internos y externos de los fotorreceptores, el microvilli de las células de Müller y las prolongaciones internas de las células pigmentarias cuyos somas forman el **epitelio pigmentario (EP)**. La **membrana limitante interna (MLI)** está formada por la yuxtaposición, en uniones de tipo especializado, de los pies de conexión

vítreos de las células de Müller, y se encuentra separada del humor vítreo por la lámina basal.

La célula de Müller es la única célula retiniana que ocupa todas las capas de la retina, desde la MLE hasta la MLI.

2.1.1 LA GLIA DE LA RETINA

Clásicamente la glía del SNC se ha clasificado en dos grupos, la microglía y la macroglía. La **microglía**, descrita por vez primera por Río-Hortega (1919), está formada por varias poblaciones celulares con diferentes morfologías que tienen función fagocítica, por lo que se las considera parte del sistema retículo endotelial. Aunque su origen ha sido muy discutido (Theele y Streit, 1993), Río-Hortega ya apuntó que estas células podrían originarse de monocitos sanguíneos. En la actualidad se ha comprobado que las células microgliales derivan de precursores de la médula ósea que migran al SNC durante el desarrollo y en respuesta a diversas lesiones (Wolter, 1956; Boya y col., 1986; 1987; 1991; Hickey y Kimura, 1988; Jordan y Thomas, 1988; Leong y Ling 1992; Ling y Wong, 1993; Sievers y col., 1994). Se establecen en la retina durante el desarrollo (Hume y col., 1983; Ashwell, 1989) y son capaces de migrar, hacia zonas lesionadas en las que hay muerte celular (Thanos, 1992). La **macroglía** incluye a los astrocitos y a los oligodendrocitos, ambos de origen ectodérmico como el resto de las células del SNC. Los **astrocitos** son células de aspecto estrellado con somas pequeños e irregulares y

numerosas prolongaciones. En base a su morfología se dividen en fibrosos, que se sitúan en la sustancia blanca, y protoplásmicos, que se encuentran en la sustancia gris. Los **oligodendrocitos** son pequeñas células con menos prolongaciones que los astrocitos. Se encuentran en el SNC mielinizando los axones de las neuronas. También se incluyen dentro de la clasificación de oligodendrocitos a las células satélites que rodean a los somas de algunas neuronas (Río-Hortega, 1919). (Lámina II).

En el SNC existen varias poblaciones de células gliales, entre ellas destacamos a las células de Müller. La clasificación de las células de Müller como macroglía siempre ha sido motivo de controversia. Ya Ramón y Cajal (1892) hizo una distinción clara entre astrocitos y células de Müller considerándolas diferentes tipo de glía. Sin embargo, son numerosos los autores que consideran a las células de Müller como astrocitos modificados (Polyak, 1941; Magalhães y Coimbra, 1973; y otros muchos) o “variantes regionales del mismo tipo de macroglía”, como afirman recientemente Holländer y col. (1991). Otro autores, han señalado que esto podría ser una simplificación puesto que presentan también características ultraestructurales de oligodendrocitos (Rhodes, 1984; Stefansson y col., 1984; Prada, F. y col., 1989) y endimocitos (Prada, F. y col., 1989).

En las retinas avasculares de algunas especies de vertebrados como es el caso del pollo, hay un solo tipo de glía, la célula de Müller o glía radial de la retina. Estas células fueron descritas por primera vez en 1851 por Müller. Se extienden radialmente entre las dos limitantes de la retina. Su

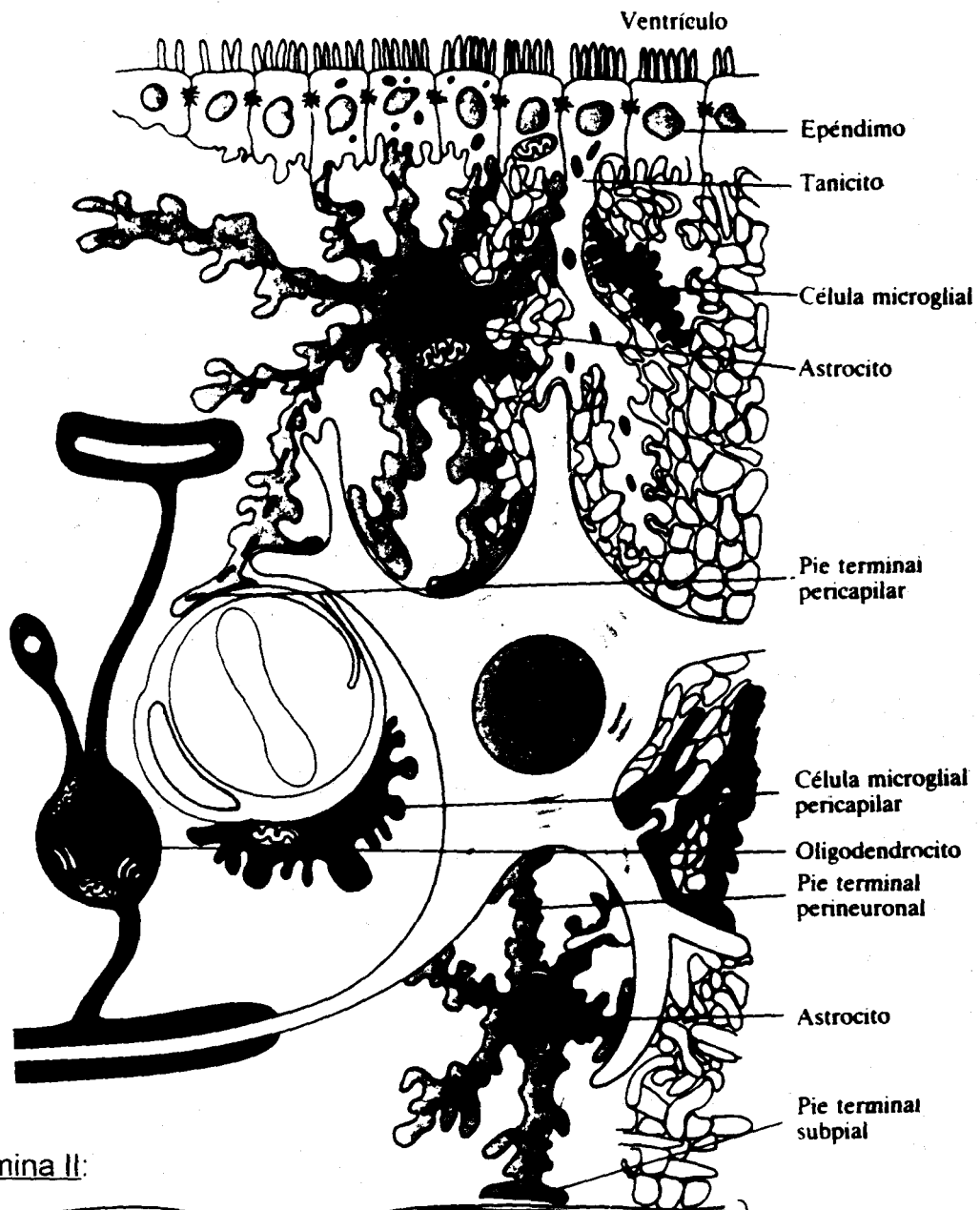


Lámina II:

Tipos de células gliales en S.N.C. (Tomado de Williams y Warwick, Piámadre
 1975. Dibujo efectuado por R. E. M. Moore.)

soma se encuentra en la CNI y las prolongaciones que parten desde sus dos polos, ventricular y vítreo, recubren buena parte de la superficie de las neuronas de la retina. En las retinas vasculares de otras especies, principalmente de mamíferos, se encuentran todos los otros tipos de células gliales: microglía, astrogía y oligodendroglía.

La astrogía de la retina fué descrita por Ramón y Cajal (1892). En las retinas sólo parcialmente vascularizadas, los astrocitos se encuentran en las zonas donde hay vasos sanguíneos y no en las zonas avasculares (Stone y Dreher, 1987). Se sitúan entre las prolongaciones de las neuronas, principalmente en la CFNO y adoptan distintas morfologías según su localización (Stone y Dreher, 1987; Distler y col., Ramírez y col., 1994), aunque tanto su morfología como su distribución puede variar en respuesta a distintas lesiones de la CFNO (Karschin y col., 1986). En algunas retinas, la misma población de astrocitos puede estar asociada a los axones y a los vasos sanguíneos (Karschin y col., 1986; Stone y Dreher, 1987; Distler y col., 1993; Rungger-Brändle y col., 1993; Ramírez y col., 1994). En la retina de conejo, sin embargo, hay dos poblaciones separadas, una que se asocia con los axones y otra que se asocia con los vasos sanguíneos (Schnitzer, 1988). Estos astrocitos que forman la glía perivascular a su vez presentan varios tipos en base a su morfología (Triviño y col., 1992). Hay evidencias que demuestran que los astrocitos pueden ser de origen extraretinal y que penetran en la retina desde el nervio óptico (Watanabe y Raff, 1988). La entrada ocurre antes del establecimiento de la vascularización cuya

formación parece inducir (Jiang y col., 1995) puesto que los astrocitos promueven la diferenciación de precursores endoteliales preexistentes.

En la parte mielinizada de la retina de conejo se ha descrito además la existencia de oligodendroglía (Berliner, 1931; Schnitzer, 1988; Robinson y col., 1993; Ehinger y col., 1994), hecho que no ha sido señalado en la retina de otras especies. En la retina de pollo hay trabajos que señalan la existencia de un pequeño número de células gliales cuyos somas se sitúan en la CCG (Ehrlich, 1981) y que son aproximadamente el 5% del total de células en esa capa. Esta población, estaría formada mayoritariamente por oligodendrocitos que se forman tras la salida del ciclo de todas las neuronas y de las células de Müller y cuyos precursores proliferan extraventricularmente

2.2. GLUTAMATO

La diferencia más notable entre los neurotransmisores aminoácidos y otros neurotransmisores es su alto contenido en el tejido nervioso y su constante presencia y participación en múltiples procesos bioquímicos generales, tales como la biosíntesis proteica y el metabolismo intermediario. Su amplio uso en la sinapsis centrales y periféricas del sistema nervioso de muchas especies, indican que deben poseer propiedades especiales que les confieren un valor altamente competitivo en la selección evolutiva (Bradford, 1988).

Hasta el momento actual, cinco aminoácidos comunes han sido

considerados como poseedores de funciones neurotransmisoras. De ellos, el glutamato (GLU) y el aspartato actúan como neurotransmisores excitadores, mientras que el GABA y la glicina lo hacen como neurotransmisores inhibidores. La taurina posee propiedades inhibitorias, aunque existen evidencias que parecen indicar que actúan más como un neuromodulador de la actividad nerviosa que como un neurotransmisor clásico (Bradford, 1988).

El GLU es el neurotransmisor excitador más utilizado en la sinapsis excitadoras del SNC de los mamíferos y realiza un importante papel en una extensa variedad de funciones del SNC (Headley y Grillner, 1990; Hollmann y Heinemann, 1994). Las neuronas que utilizan neurotransmisores aminoácidos excitadores en sus sinapsis están ampliamente distribuidas a través del SNC (Cotman y Monaghan, 1987; Young y Fagg, 1990) pero se concretan particularmente a nivel del hipocampo, capas externas de la corteza cerebral (Jansen y cols., 1989) y sustancia gelatinosa de la médula espinal (Shaw y cols., 1991). A su vez, la localización inmunohistoquímica de las células glutamatérgicas se ha llevado a cabo en numerosas estructuras neuronales tales como el hipocampo (Storm-Mathisen y cols., 1986), cerebelo (Somogyi y cols., 1986) y retina (Ehinger y cols., 1988).

En la retina de los vertebrados, y gracias a la reciente localización inmunocitoquímica de los neurotransmisores aminoácidos, se ha podido constatar que en las cadenas sinápticas establecidas entre los fotorreceptores, células bipolares y células ganglionares, también

denominada “vía vertical de la retina”, el neurotransmisor utilizado es el GLU; mientras que en la “vía lateral de la retina”, constituida por células amacrinas, horizontales e interplexiformes, son la glicina y el GABA los neurotransmisores usados (MARC, 1986; KALLIONATIS y MARC, 1992).

2.2.1. SINTESIS Y LIBERACION DE GLUTAMATO.

Los neurotransmisores aminoácidos excitadores GLU y aspartato son aminoácidos dicarboxílicos. Ambos pueden ser biosintetizados por transaminación de sus cetoácidos correspondientes (2-oxoglutarato y oxaloacetato, respectivamente) cuando son producidos en el interior de la matriz mitocondrial, durante el ciclo de Krebs. Así, el GLU se produce principalmente por la transaminación de 2-oxoglutarato mediante la enzima aspartato aminotransferasa (E C 2.6.1.1.) y del 2-oxoglutarato e iones amonio a través de la acción de la glutamato deshidrogenasa (E C 1.4.1.3.). Otra fuente para la biosíntesis de GLU es la glutamina, que se convierte fácilmente en GLU por la acción de la enzima glutaminasa (E C 3.5.1.2.) que es igualmente una enzima de tipo mitocondrial (Bradford, 1988).

Otras vías posibles de producción de GLU para la neurotransmisión parece estar relacionada al metabolismo de la arginina ornitina y prolina a través de la arginasa, ornitina aminotransferasa y prolina oxidasa, en las que el GLU semialdehído es un intermediario. La velocidad de síntesis en estas vías es lenta y su contribución en la biosíntesis del GLU muy pequeña (Bradford, 1988; Hall, 1992).

Otra fuente de obtención del GLU es mediante su reciclado. Después de ser liberado por las neuronas, el GLU es captado por las células gliales y amidatado a glutamina (Hall, 1992; Herzt y cols., 1992), transformación que es catalizada por la enzima glutamina sintetasa (Hamberger y cols., 1978; Prada y cols., 1998). Una vez convertido el GLU en glutamina, ésta es liberada por las células gliales y captada de nuevo por las neuronas para convertirla en GLU (Kaneko y Mizumo, 1992; Ishikawa y cols., 1996). (Lámina III).

La liberación de GLU desde la terminal presináptica es dependiente de Ca^{2+} y está regulada por múltiples tipos de canales de Ca^{2+} . De ellos son los tipo N y tipo P los que tienen una mayor importancia en la liberación de neurotransmisores excitadores dentro del SNC, aunque otros tipos de canales de Ca^{2+} como son los Q y R también pueden intervenir (Dunlap y cols., 1995). Tras su liberación el GLU es captado por sus receptores específicos y desencadena la respuesta postsináptica.

2. 2. 2. RECEPTORES.

Los avances en Biología Molecular han permitido clonar y caracterizar a los receptores para GLU (Hollmann y Heinemann, 1994). Se han identificado dos grupos o familias principales: la familia de los *receptores ionotrópicos (iGLU-receptores)*, ligados a canales permeables a los iones de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ (Wisden y Seeburg, 1993; Hollmann y Heinemann, 1994; Petralia y Wenthold, 1995), y la familia de los *receptores*

Lámina III:

A: Terminal presináptica. **B:** Terminal postsináptica. **C:** Célula glial.

GLU: Glutamato. **GS:** Glutamina sintetasa.

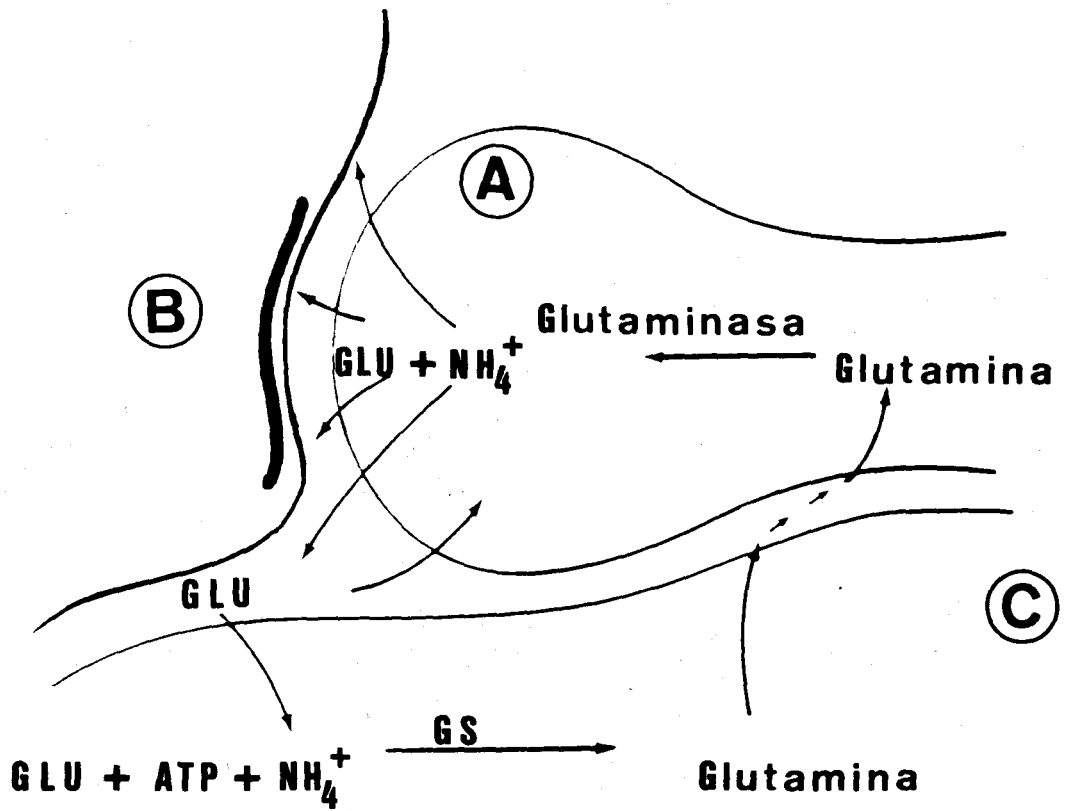


Lámina III:

Modelo de recaptación del glutamato entre neuronas, glia y espacio extracelular propuesto para el tejido cerebral. (Modificado de Bradford, 1988).

metabotrópicos (mGLU-receptores) que actúan mediante un sistema de segundos mensajeros unidos a proteína G (Schoepp y Conn, 1993; Bittigau e Ikonomidou, 1997).

La familia de los iGLU-receptores se han clasificado por la activación de sus agonistas específicos en tres subtipos: AMPA receptores (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropiónico), KA receptores (cainato) y NMDA receptores (N-metil-D-aspartato). Dentro de cada uno de estos tres subtipos se han podido aislar varios tipos de subunidades de acuerdo a sus propiedades biofísicas y funciones fisiológicas (Hollmann y Heinemann, 1994). A su vez, en la familia de los mGLU receptores se han individualizado ocho subunidades (Miller, 1994).

En términos generales mientras que la activación de los iGLU receptores tiene como resultado el desencadenar una respuesta (tal y como por ejemplo despolarización de membrana) en pocos milisegundos, la respuesta neuronal provocada por la activación de los mGLU receptores, se produce en una escala de tiempo que oscila entre los cientos de milisegundos a segundos (Hudspith, 1997).

Estudios recientes han venido a demostrar que durante el desarrollo embrionario se producen cambios en la expresión de dos subtipos de la familia de los iGLU receptores como son los AMPA receptores y los KA receptores, así como en diferentes subunidades de la familia de los mGLU receptores.

De esta forma en las primeras fases del desarrollo, durante la fase

de intensa sinaptogénesis, se produce un incremento en la expresión de los receptores AMPA y KA que es seguida a continuación por una disminución conforme avanza el desarrollo (Mc Donald y Johnston, 1990; Pellegrini-Giampietro y cols., 1991; Gallo y cols., 1992). Además el patrón de distribución de los receptores AMPA y KA también parecen estar regulados por el desarrollo (Monyer y cols., 1991).

Todo ello unido al hecho de que ciertas subunidades de la familia de los mGLU receptores se encuentren muy bajas en el momento del nacimiento, a nivel del cerebro de la rata; mientras que otras que se expresan fuertemente en dicho momento, para luego decrecer durante la fase de maduración (Shigemoto y cols., 1992), han llevado a formular la hipótesis de que sean diferentes subunidades de ambas familias de GLU receptores las que realicen un papel principal durante el proceso de la sinaptogénesis, mientras que otras distintas serían las encargadas de modular la transmisión sináptica adulta (Catania y cols., 1994).

Las neuronas que poseen receptores para el GLU están ampliamente distribuidas en distintas poblaciones neuronales y gliales del sistema nervioso. Concretamente, en la retina, mediante técnicas de hibridación in situ se ha podido localizar la presencia de m-GLU receptores a nivel del mRNA (Azakawa y cols, 1994; Hartveit y cols., 1995), y a nivel proteico mediante técnicas inmunocitoquímicas (Peng y cols., 1995; Brandstätter y cols, 1996).

2.2.3. GLUTAMATO Y EXCITOTOXICIDAD

Los primeros datos que se obtuvieron acerca de las propiedades neurotóxicas del GLU fueron aportados por Lucas y Newhouse (1957), los cuales demostraron que la administración sistémica de GLU en ratones, causaba degeneración en la retina. Posteriormente, Olney (1969b; 1971) corroboró que la administración oral de GLU, en monos y roedores, producía degeneración neuronal en ciertas áreas del cerebro carentes de barrera hematoencefálica. Ulteriores estudios vinieron a demostrar una directa correlación entre las propiedades neurotóxicas y neuroexcitadoras del GLU y la neurotoxicidad inducida por GLU tras la activación de los receptores de los aminoácidos neurotransmisores excitadores (Olney y Ho, 1970; Olney, 1982).

El término de excitotoxicidad se acuñó para describir este proceso mediante el cual una combinación de dos factores como son: de un lado, el incremento de los niveles extracelulares de GLU; y de otro, la pérdida de la capacidad de la célula para defenderse, conllevan a que la exposición al GLU tengan sobre las neuronas un efecto citotóxico (Choi, 1997), siendo la sobreexcitación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de GLU el mecanismo por el cual se dispara la excitotoxicidad (McDonald y Schoepp, 1992; Schoepp y cols., 1995). Actualmente el término de excitotoxicidad se emplea para hacer referencia al daño neuronal o muerte neuronal inducida por la exposición a GLU o a otros neurotransmisores aminoácidos excitadores (Choi, 1997).

Durante los últimos veinticinco años se han investigado exhaustivamente los mecanismos que median en la excitotoxicidad. Estos mecanismos moleculares que intervienen en el desencadenamiento de esta cascada neurotóxica han sido revisados recientemente por Lynch y Dawson (1994), pudiendo resumirse, tal y como recogemos gráficamente en la Lámina IV, de la siguiente manera: la activación incontrolada de los iGLU receptores y mGLU receptores provoca una entrada masiva de Ca^{2+} dentro de la célula, lo cual unido a una liberación de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares, conlleva a una activación incontrolada de las proteínas quinasas, fosfolipasas, proteasas y óxido nítrico sintetasa neuronales que conducen, a su vez, a la aparición de radicales libres, peroxidación lipídica y proteolisis, provocando en último lugar la degeneración del SNC por muerte neuronal. Aunque esta muerte neuronal puede producirse en cuestión de minutos, desde que dispara la cadena neurotóxica y una proporción considerable de neuronas mueren durante la fase aguda del trauma, un número no despreciable de neuronas pueden sufrir una muerte retrasada (Lynch y Dawson, 1994; Hudspith, 1997).

En la excitotoxicidad que produce el GLU se constatan tres hechos altamente llamativos:

- 1.- Los principales efectos agudos ocurren sobre las dendritas y los somas celulares, siendo la degeneración axonal un proceso de degeneración secundaria ya que, rara vez, los axones degeneran de forma primaria (Mattson y cols., 1988; Weiler y Schultz, 1993).

Lámina IV:

El esquema muestra como un aumento en la concentración de glutamato extracelular, desencadena una cascada excitotóxica como consecuencia de la activación incontrolada de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos del glutamato. **(a)**: despolarización y generación del potencial de acción. **AMPA**: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato. **AMP_c**: AMP cíclico. **Ca²⁺** : Liberación de depósitos de calcio intracelular. **Ca²⁺**: Entrada de calcio a través de canales de calcio regulados por voltaje. **(C. Ca²⁺ R. V.)**. **Ca²⁺/CAMQ**: Complejo de calcio-calmodulina quinasa. **IE.C.**: Deplección energética celular. **FLA₂**: Fosfolipasa A₂. **FLC**: Fosfolipasa C. **G**: Proteína G. **GMP_c**: GMP cíclico. **mGLU**: Receptores metabotrópicos de glutamato. **KA**: Cainato. **NMDA**: N-metil-D-aspartato. **NOS**: Oxido nítrico sintetasa. **↑P.L.**: Aumento de peroxidación lipídica. **P.Q.**: Proteína quinasa. **↑ R.L.**: Formación de radicales libres.

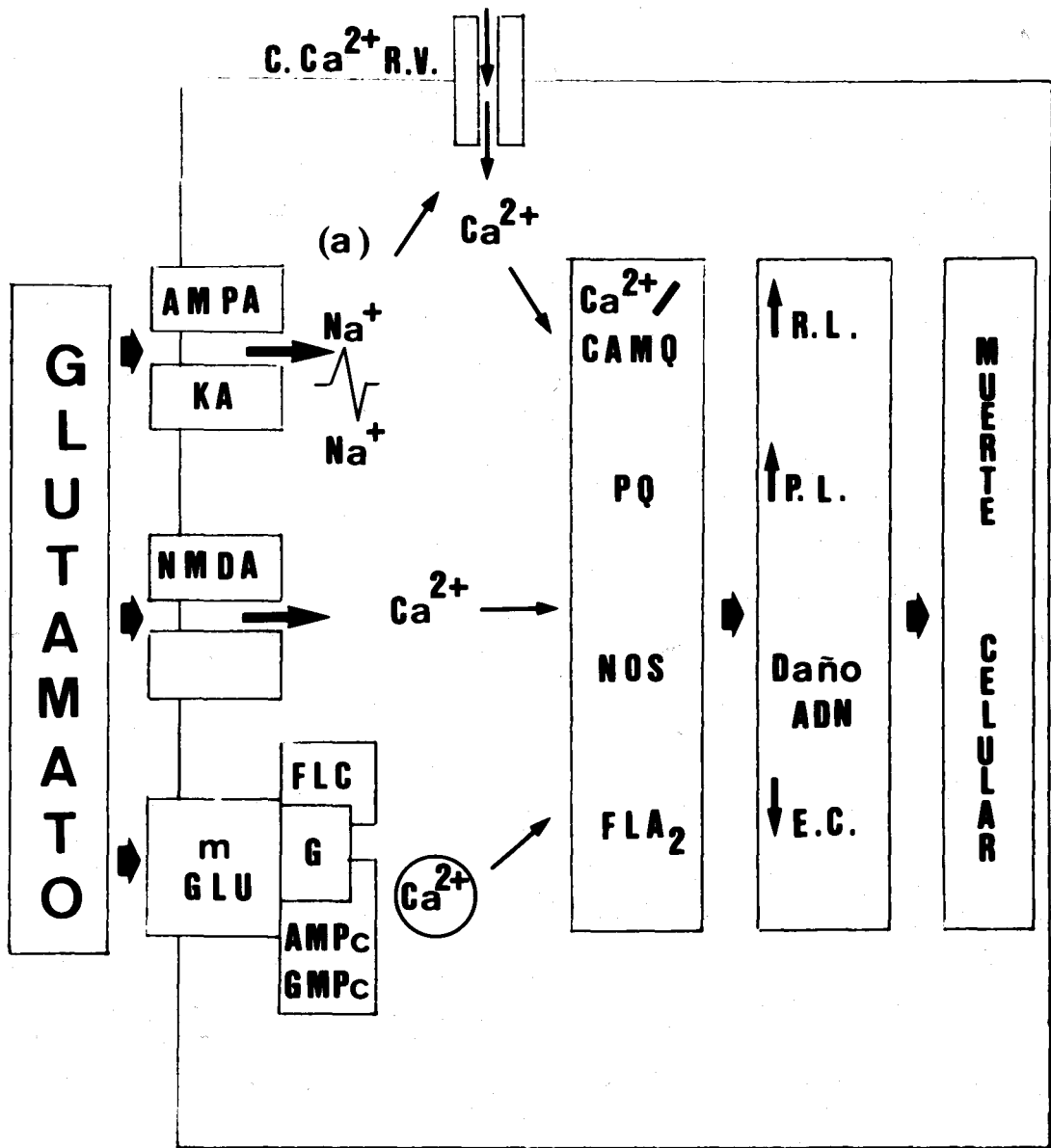


Lámina IV:

Representación esquemática del modo de actuación del glutamato en la producción del daño neuronal. (Modificado de Lynch y Dawson, 1994).

2.- Las células no neuronales (glía, células ependimarias y astrocitos) no degeneran por exposición a excitotoxinas (Choi, 1992; 1997).

3.- No todas las células nerviosas responden de la misma manera ante una afrenta excitotóxica (Choi, 1992; 1997).

2.3. MELATONINA

2.3.1. SINTESIS Y LIBERACION DE MELATONINA.

La melatonina (MEL) o N-acetil-5-metoxitriptamina fue aislada de la glándula pineal de los mamíferos y caracterizada químicamente por Lerner y cols. (1959). La biosíntesis de la MEL fue descrita inicialmente por Weissbach y Axelrod (1960) y por Weissbach y cols. (1960), como un proceso mediante el cual la MEL es sintetizada a partir de la 5-hidroxitriptamina a través de un doble proceso químico consistente en: acetilación de la función amina de la 5-hidroxitriptamina y metilación de su grupo fenol. Posteriormente, se ha podido constatar que la MEL se sintetiza a partir de su aminoácido precursor: L-triptófano por la acción consecutiva de cuatro enzimas; la triptófano hidrolasa (TPH; EC 1. 14. 16. 4) que cataliza el paso de L-triptófano a 5-hidroxitriptófano; la amino aromática ácido decarboxilasa (AAAD; EC 4. 1. 1. 28) que cataliza el 5-hidroxitriptófano a 5-hidroxitriptamina; la serotonín N-acetiltransferasa (NAT; EC 2. 3. 1. 87) que convierte la 5-hidroxitriptamina en N-acetil-5-hidroxitriptamina; y la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT; EC 2. 1. 1. 4.) que conduce a la formación de la N-acetil-5-metoxitriptamina o MEL. Las

dos últimas enzimas citadas NAT e HIOMT requieren de la presencia de dos cofactores como son el acetil coenzima A (AcCoA) y S-adenosil-L-metionina (SAM), respectivamente (Cahill y cols., 1991; Zawilska, 1996).

Durante las últimas décadas numerosos trabajos han venido a demostrar que la MEL no sólo es sintetizada a nivel de la glándula pineal, sino que también se sintetiza a nivel de la retina de los vertebrados (Cardinali y Rosner, 1971; Gern y Ralph, 1979) . En ambos tejidos su síntesis se lleva a cabo por una vía metabólica similar que incluye la acción secuencial de la NAT y de la HIOMT (Binkley y cols., 1979; Nagle y cols., 1972, 1973; Rubio y cols., 1993; Espinar y cols., 1994).

El hecho más llamativo en la producción de MEL por parte de ambos órganos, en las diferentes especies de vertebrados, incluida la humana, es la regulación que la luz ejerce sobre la biosíntesis de MEL. Así, la oscuridad incrementa los niveles de MEL, mientras que la luz lo reduce drásticamente. Debido a este mecanismo regulador de los niveles de MEL dependiente de la luz, puede afirmarse como hecho plenamente constatado que la producción y liberación de MEL posee un ritmo circadiano en todas las especies de animales vertebrados que se han estudiado (Reiter, 1991, 1997).

En los mamíferos, el marcapaso (o conductor oscilador) que controla el ritmo de la biosíntesis de la MEL en la glándula pineal se localiza en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Las fibras retino-hipotalámicas, cuyos pericarios se localizan en la capa de células ganglionares de la retina,

sincronizan su actividad cada 24 horas y median en la información fotónica del oscilador. En las aves, la glándula pineal es directamente fotosensible y contiene un marcapasos u oscilador endógeno que genera el ritmo circadiano de producción de MEL (Robertson y Takahashi, 1988; Zatz y cols., 1988; Murakami y cols., 1994).

El ritmo de biosíntesis de MEL retinal está regulado por un reloj biológico ubicado dentro de la propia retina. Numerosas evidencias parecen indicar que sean las células fotorreceptoras de la retina quienes lleven a cabo este papel de oscilador biológico. (Underwood y cols., 1990; Zawilska y Iuvone, 1992; Cahill y Besharse, 1993).

El mecanismo de liberación de MEL no se conoce suficientemente de forma satisfactoria. El hecho de que los niveles de MEL en sangre sean elevados durante las fases de oscuridad y bajos durante las fases de luz, parece indicar que presumiblemente la MEL se libere por simple difusión desde los pinealocitos, coincidiendo con el momento en el que sus niveles están más elevados (Reiter, 1991, 1993). Una vez que la MEL se encuentra ya en el torrente circulatorio, su alta liposolubilidad hace que la MEL difunda rápidamente desde la sangre hacia otros fluidos orgánicos como son el líquido cefalorraquídeo (Hedlund y cols., 1976), saliva (Vakkuri, 1985), líquido folicular ovárico y humor acuoso de la cámara anterior del ojo (Reiter, 1997). Cuando la MEL es administrada de forma exógena, los niveles hemáticos y su difusión hacia otros fluidos orgánicos se incrementan considerablemente (Menendez-Peláez y cols., 1993).

Si bien es cierto, que hasta la fecha se tienen pocos datos de los niveles tisulares de MEL y de su distribución intracelular en los diferentes órganos; no deja de ser un hecho plenamente constatado, de que al ser un compuesto altamente liposoluble y relativamente soluble en agua (Shida y cols., 1994), la MEL tiene la capacidad de ingresar rápidamente dentro de las células. Además, al conocer que la MEL atravesaba rápidamente la barrera hematoencefálica al igual que otras barreras morfológicas, se tuvo la certeza de que difundía rápidamente en cada célula del organismo (Menéndez-Peláez y Reiter, 1993). Estas afirmaciones se confirmaron con los resultados obtenidos por Menéndez-Peláez y cols. (1993), en los que demuestra como los niveles de MEL en los núcleos de las células de la corteza cerebral de la rata, que durante la noche alcanzan valores de 30 pg/mg ADN, se incrementan hasta alcanzar los 150 pg/mg ADN cuando la MEL se administra exógenamente.

2. 3. 2. MELATONINA Y NEUROPROTECCION: ACCION ANTIOXIDANTE DE LA MELATONINA

Durante muchas décadas, las acciones que la literatura científica han atribuido a la MEL la han relacionado con funciones ligadas al ritmo circadiano, sistema endocrino, sistema inmunológico, sueño-vigilia y fisiología retinal (Reiter, 1980; Cassone, 1991). Ha sido a partir de los últimos años, cuando se han ido acumulando sólidas evidencias que

otorgan a la MEL un papel trascendental más allá de estos sistemas, relacionándola, por citar algunos ejemplos, con efectos beneficiosos sobre el SNC (Acuña-Castroviejo y cols. 1995) y el crecimiento tumoral (Blask y cols. 1994) , que se fundamentan en la acción antioxidante que posee la MEL (Reiter y cols., 1995).

Los antioxidantes son moléculas que protegen a las células del daño causado por la producción de radicales libres, actuando sobre el metabolismo enzimático que los genera. Ianas y cols. (1991) fueron los primeros que investigaron el potencial de la MEL como antioxidante. Posteriormente, las propiedades antioxidantes de la MEL han sido demostradas tanto *in vivo* como *in vitro* (Reiter, 1995).

In vitro, Tan y cols. (1993) y Chan y Tang (1996) han demostrado la capacidad que posee la MEL para limpiar o neutralizar ("*scavenger*") los radicales hidroxilos y de reducir la acción del daño biológico causado por el oxígeno (Cagnoli y cols., 1995), radicales peróxidos (Pieri y cols., 1994; Scaiano, 1995), siendo capaz de contrarrestar la peroxidación lipídica inducida por diferentes agentes (Daniels y cols., 1995; Sewerynek y cols., 1995).

In vivo, la MEL atenúa los hallazgos de los daños cerebrales ocasionados por la administración de cainato en ratas adultas (Giusti y cols., 1996 a y b).

Estos efectos, acompañados por la facilidad que posee la MEL para traspasar cualquier barrera fisiológica y penetrar en cualquier

compartimento intracelular, otorgan a la MEL una acción antioxidante que sirve de base para postular su papel como agente neuroprotector.

3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION

El Glutamato es el mayor neurotransmisor excitador del Sistema Nervioso Central (SNC) (Headley y Grillner, 1990). Las neuronas que utilizan este neurotransmisor en sus sinapsis están ampliamente distribuidas en el SNC, pero se concentran particularmente en el hipocampo, capas externas de la corteza cerebral y sustancia gelatinosa de la médula espinal (Jansen y cols., 1991; Seeburg, 1993). No obstante, la localización de células glutamatérgicas también se ha llevado a cabo en otras regiones del SNC como la retina (Barnstable, 1993) y el cerebelo (Somogyi y cols., 1986).

Los estudios realizados por Lucas y Newhouse (1957), en ratones jóvenes inyectados con GLU, demostraron que éstos se quedaban ciegos tras dos semanas de tratamiento. Posteriormente otros autores (Cohen, 1967; Olney, 1969a), señalaron que los ratones y ratas inyectadas neonatalmente con GLU mostraban alteraciones de las células retinianas, con excepción de las células fotorreceptoras. En las últimas décadas, los estudios realizados, a este respecto, no han sido muy numerosos. No obstante, los trabajos de Reif-Lehrer y cols. (1971) y Blanks y cols. (1981), realizados sobre retinas de embriones de pollo aisladas y cultivadas en presencia de GLU, corroboran las aportaciones realizadas por los autores anteriormente citados, a la vez que señalan que, "in vivo", la retina es protegida de la acción del GLU por la barrera vascular retiniana.

La acción del glutamato es mediada por receptores para el glutamato que se dividen en dos tipos: Ionotrópicos y Metabotrópicos. (Schoepp y Conn, 1993; Wisden y Seeburg, 1993). Los **receptores ionotrópicos**, que actúan ligados a canales permeables a los iones de sodio y calcio, se han identificado farmacológicamente mediante la activación de sus agonistas específicos en tres subtipos: AMPA receptores (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalolepropionato), KA receptores (Kainato) y NMDA receptores (N-metil-D-aspartato) (Hudspith, 1997). Los **receptores metabotrópicos** actúan mediante un sistema de segundo mensajero unido a proteína G (Pin y Duvoisin, 1995). La diferencia entre la activación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos radica en que los primeros son capaces de provocar una respuesta celular (Ej: despolarización de membrana) en pocos milisegundos, mientras que los segundos la provocan en una escala de tiempo que oscila entre cientos de milisegundos a segundos (Hudspith, 1997).

En estudios realizados sobre modelos animales se ha podido constatar que tras daño traumático o isquémico al SNC, se produce una liberación patológica de glutamato desde neuronas y glia al medio extracelular. Esta liberación extracelular de glutamato activa una cascada de excitotoxicidad en la que están involucrados tanto los receptores ionotrópicos como los metabotrópicos. Es interesante señalar que aunque la muerte neuronal puede ocurrir en minutos, ya que el mayor número de

neuronas mueren en la fase aguda del trauma; una gran cantidad de neuronas son susceptibles de sufrir una muerte tardía, cuando el trauma ya ha cesado, debido a que los niveles de glutamato se mantienen elevados durante días (Lynch y Dawson, 1994).

El mecanismo molecular por el cual tiene lugar esta cascada neurotóxica puede resumirse de la siguiente manera: La activación de los receptores glutamatérgicos provoca un aumento del depósito de calcio intracelular, esto determina a su vez una incontrolada activación de los sistemas de las proteínas quinasas neuronales, fosfolipasas, proteasas y óxido nítrico sintetasa, que trae como consecuencia el establecimiento de fenómenos proteolíticos, peroxidación lipídica, y formación de radicales libres que conducen inexorablemente a la muerte celular (Linnch y Dawson, 1994).

Las propiedades antioxidantes de la melatonina están ampliamente documentadas tanto *in vitro* como *in vivo* (Reiter y cols., 1995). *In vitro*, la melatonina es capaz de limpiar los radicales hidroxilos (Tan y cols., 1993) y de reducir la acción del daño biológico del oxígeno (Cagnoli y cols., 1995). Además, la melatonina es capaz de contrarrestar la peroxidación lipídica inducida por numerosos agentes (Daniels y cols., 1995; Sewerynek y cols., 1995). *In vivo*, la melatonina protege contra la excitotoxicidad causada por la administración de cainato intraperitoneal en ratas adultas (Giusti y cols.,

1996), y de la apoptosis causada en el hipocampo, amígdala y corteza endorrinal de ratas adultas, cuando se les administra cainato intraperitonealmente . La melatonina cumple además con el requisito fundamental para funcionar como antioxidante, esto es: ser capaz de llegar directamente al sitio donde se están produciendo los radicales libres. Esta capacidad la tiene la melatonina gracias a que es un compuesto altamente liposoluble, capaz de atravesar rápidamente todas las barreras morfológicas y entrar de lleno dentro de las células (Reiter y cols., 1997).

A la vista de los antecedentes comentados, en la presente Tesis Doctoral pretendemos evaluar, "in vivo", el posible efecto neuroprotector que ejerce la melatonina sobre el desarrollo neuroglial de la retina en embriones de pollo tratados con glutamato.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para la realización del presente estudio hemos utilizado retinas de embriones de pollo de la raza Ross-1. Los huevos fecundados se obtuvieron de diferentes granjas especializadas. Los embriones fueron incubados a temperatura constante de 37.5°C y en atmósfera húmeda del 80% en una incubadora (Masalles, modelo 25) provista de termostato y sistema automático de volteo. Previamente al inicio de la incubación los huevos fueron colocados en posición vertical, con el polo agudo dirigido hacia abajo, para facilitar la posterior localización del embrión y la maniobra de inyección. En esta posición se mantuvieron durante 12 a 14 horas, en un lugar fresco y seco para que el inicio de la incubación fuese el mismo en todos los embriones.

La tabla I recoge el número total de embriones utilizados (n= 164), en el estudio con técnicas de microscopia electrónica de transmisión e inmunohistoquímica, así como el porcentaje de embriones vivos, muertos y malformados en el momento del sacrificio y no embrionados en el momento de la inyección. Las malformaciones a las que hacemos referencia fueron evaluadas macroscópicamente y consistieron en la presencia o no de anoftalmias y eventraciones.

I-2/S-13 Días	C	M	G	MG	AAA
Nº de Huevos	18	18	18	18	10
No embrionados (%)	1 (5.6)	2 (11.2)	1 (5.6)	2 (11.2)	1 (10)
Embriones vivos (%)	17 (94.4)	16 (88.8)	9 (50)	12 (66.6)	5 (50)
Embr. muertos (%)	0 (0)	0 (0)	7 (38.8)	4 (22.2)	2 (20)
Malformados (%)	0 (0)	0 (0)	1 (5.6)	0 (0)	2 (20)
I-6/S-20 Días	C	M	G	MG	AAA
Nº de Huevos	18	18	18	18	10
No embrionados (%)	3 (16.7)	2 (11.2)	2 (11.2)	1 (5.6)	1 (10)
Embriones vivos (%)	15 (83.3)	16 (88.8)	8 (44.4)	13 (72.2)	6 (60)
Embr. muertos (%)	0 (0)	0 (0)	5 (27.7)	4 (22.2)	2 (20)
Malformados (%)	0 (0)	0 (0)	3 (16.7)	0 (0)	1 (10)

Tabla I: Incidencia del nº total de embriones utilizados, no embrionados, vivos, muertos y malformados, inyectados a los 2 (**I-2**) y 6 días de incubación (**I-6**) y sacrificados a los 13 (**S-13**) y 20 días de desarrollo (**S-20**), para cada uno de los grupo control y experimentales: **C:** grupos control; **M:** inyectados con melatonina; **G:** inyectados con glutamato monosódico; **MG:** inyectados con melatonina y glutamato monosódico. **AAA:** inyectados con D,L-Alfa aminoacídico.

Para ello, hemos realizado 1 tanda control y 4 tandas experimentales divididas cada una de ellas en 2 grupos: un 1^{er} grupo, en el cual los embriones se inyectaron, en saco vitelino, en el 2^o día de incubación (E-2; n=82) y se sacrificaron a los 13 días de desarrollo (E-13; n=82) y un 2^o grupo, en el que los embriones fueron inyectados, en saco vitelino, en el 6^o día de incubación (E-6; n=82) y sacrificados a los 20 días de desarrollo (E-20; n=82). Todos los embriones fueron sistemáticamente catalogados según las tablas de Hamburger y Hamilton (1951), tanto en el momento de la inyección como en el del sacrificio.

Para realizar las inyecciones se procedió a efectuar un pequeño orificio en el polo romo del huevo que permitiera la introducción de una micropipeta de precisión, provista de punta estéril y desechable. Tras la inyección, la ventana fue cerrada con parafilm fijado a la cáscara mediante espátula caliente.

El Glutamato Monosódico, el ácido D,L-Alfa aminoácido (AAA) y la Melatonina se obtuvieron de Sigma Chemical Corporation y se prepararon a unas concentraciones de 1mM (GLU y AAA) y 4 mM (MEL); usando como vehículo dilutor agua destilada y etanol absoluto. La concentración final de etanol en cada una de las mismas fue de 0.5%.

Los embriones fueron inyectados según las siguientes dosis y pautas:

* *Embriones Control (Grupo C)*: 100 μ l de vehículo dilutor (etanol

absoluto en agua destilada al 0.5%. (n= 36).

* *Embriones inyectados con Melatonina (Grupo M)*: 100 μ l de Melatonina 4mM. (n= 36).

* *Embriones inyectados con Glutamato (Grupo G)*: 100 μ l de Glutamato Monosódico 1mM. (n=36).

* *Embriones inyectados con Melatonina y Glutamato (Grupo MG)*: 100 μ l de Melatonina 4mM administrada media hora antes de la inyección de 100 μ l de Glutamato Monosódico 1mM. *n = 36.*

* *Embriones inyectados con D-L-Alfa aminoácido (Grupo AAA)*. 200 μ g de D,L-Alfa aminoácido 1mM (n= 20)

En la tabla II recogemos el número total de embriones utilizados (n= 83) para nuestro estudio con técnicas argentícas. En él, hemos realizado 2 tandas: una tanda control y otra experimental de embriones tratados con GLU, en las que los embriones se inyectaron, en saco vitelino, en el 2º día de incubación (E-2; n=83), para ser sacrificados a los 8 (E-8; n=10), 9 (E-9; n=10), 12 (E-12; n=25), 13 (E-13; n=25) y 15 (E-15; n=10) días del desarrollo. Las dosis y pautas de inyección, fueron idénticas a las que, previamente, hemos descrito para el estudio de microscopia electrónica de transmisión e inmunohistoquímica.

Estadio de Sacrificio	C	G
E-8	10	-
E-9	10	-
E-12	10	15
E-13	10	15
E-15	10	-

Tabla II: Número total de embriones inyectados a los 2 días de incubación (E-2) y sacrificados a los 8 (E-8), 9 (E-9), 12 (E-12), 13 (E-13) y 15 (E-15) días del desarrollo, para los embriones del grupo control: **C**, y experimentales tratados con glutamato: **G**.

4.2. PREPARACION DEL MATERIAL PARA MICROSCOPIA LUMINICA.

Los embriones más jóvenes, desde E-3 hasta E-12 fueron procesados según el método de tinción argéntica de Golgi Stensaas (1883). A partir de E-12 y hasta la eclosión se utilizó el método de Golgi Colonnier (1883)

4.2.1. METODO DE GOLGI STENSASS

Las preparaciones histológicas de los embriones de pollo de 3 a 12 días de incubación se realizaron siguiendo el método de Golgi Stensaas (1883) consistente en: 100 ml de agua destilada, 5 gr de dicromato potásico, 5 gr de hidrato de cloral, 5 ml de glutaraldehído 25%, 5 ml de formaldehído 40%, 5 gotas de dimetilsulfósido. La duración de la fijación oscila entre 24 y 48 horas según el tamaño de la pieza. A continuación tras un breve lavado en agua destilada, las piezas se pasaron a una solución de nitrato de plata 0.75% donde permanecieron de 2 a 3 días. Una vez finalizada la impregnación se realizó una deshidratación en la serie de los alcoholes para pasarlo a través de una mezcla de alcohol-eter 50%, a las soluciones de nitrocelulosa de baja viscosidad al 5%, 10% y 20% donde finalmente se incluyeron.

Los bloques permanecieron conservados en cloroformo a 4°C hasta el momento de seccionarlos, en el que se sumergen en aceite de cedro para

aclarar el tejido. Después, el bloque se colocó en un microtomo de deslizamiento, orientándolo para cortar la retina según un plano frontal. Los cortes se realizaron seriadamente a $80\ \mu$, recogiendo éstos en tolueno para su ulterior montaje bajo cubreobjetos en un medio neutro DPX

4.2.2. METODO DE GOLGI COLONIER

Los embriones mayores de 12 días de incubación fueron enucleados, y una vez estadiados, inmersos en una solución fijadores de Golgi Colonnier (1883), consistente en: 80 ml de agua destilada, 5 gr de dicromato potásico, 20 ml de glutaraldehído 25%, en la que estuvieron de 5 a 7 días según el tamaño de la pieza. Después de ser lavados en agua destilada se sometieron a una impregnación con nitrato de plata al 0.5% durante 3 días. El resto del procesado fue idéntico al realizado con los embriones de pocos días de desarrollo

Las observaciones se hicieron en un microscopio ZEISS marca AF EOARR 65-19 con cámara fotográfica incorporada y un microscopio NIKON con cámara lúcida accesoria. Como película se utilizó Ilford-Pam 50

Las retinas satisfactoriamente teñidas, fueron observadas seriadamente y en su totalidad con objeto de ver los diferentes detalles morfológicos de las células en todo su grosor y las diferencias existentes entre la retina central y la periférica

Dado que el grosor de los cortes, $80-90\ \mu$, incluye varias capas de células, las observaciones siempre se hicieron asegurándonos de que la

célula estudiada se hallara en un plano medio del grosor del corte

4.3. PREPARACION DEL MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.

La técnica empleada para el procesado de microscopía electrónica de transmisión es la descrita por Palay y Chan Palay (1974) para el SNC. Así, las retinas fueron extraídos tras la decapitación del embrión, disecadas en una solución fijadora compuesta por paraformaldehído 2.5%, glutaraldehído 25%, cloruro cálcico 0.5% en tampón fosfato 0.4 M a pH 7.3 y con una osmolaridad de 660 m Osm, en la que permanecieron durante 24 horas a 4°C.

Tras la fijación los especímenes fueron lavados durante 1 hora a 4°C, con cambios cada 15 minutos en una solución lavadora con sacarosa al 8% en tampón fosfato 0.12 M y cloruro cálcico 0.02 mM. Posteriormente fueron postfijados durante 24 horas a 4°C en tretróxido de osmio al 1%, deshidratados en soluciones crecientes de etanol e incluidos en resina epóxica de baja densidad (TAAB) según la fórmula propuesta por Spurr (1969):

- VCD= 10grs.
- DER-76= 6grs.
- NSA= 26 grs.
- Dimetilaminoetanol= 0.4 grs.

Las secciones para el estudio de cortes semifinos fueron realizadas con cuchilla de vidrio a 2μ , teñidas según la técnica de Richardson y cols. (1960): azur 1%, azul de metileno 1% a partes iguales, durante 2 minutos a 60°C . y fotografiadas con un microscopio ZEISS Axioplan con cámara fotográfica incorporada, utilizándose para las microfotografías película ILFORD-50.

Los cortes ultrafinos de 600-800 Å de grosor se obtuvieron con cuchilla de diamante (Diatome MX3882) en un ultramicrotomo ULTRACUT-E y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963, Venable y Cosggeshall, 1965), observándose en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100 C a 80 Kv, siendo recogidos fotográficamente en placas de 6.5 a 9 cm. de Kodak Electron Microscope Film.

Al objeto de evitar posibles errores provocados por la interpretación de los diferentes aumentos utilizados en el microscopio electrónico de transmisión y su posterior ampliación en papel, los aumentos reales de las microfotografías de los cortes ultrafinos se han expresado utilizando barra de escala de 1μ . Para ello procedimos a medir, en cada caso, la distancia entre dos mismos puntos en:

A: el negativo de microscopía electrónica de transmisión.

B: el positivo del mismo en papel.

Siendo el aumento real de la foto en el positivo, el resultado de multiplicar los aumentos del negativo por el resultado de la división B:A, que

fue convertido en μ con la ayuda de una regla Photomicrograph Scale Marker™.

4.4.PREPARACION DEL MATERIAL PARA INMUNOHISTOQUIMICA.

Una vez tabulados según las tablas de Hamburger y Hamilton (1951), a los embriones jóvenes se les seccionó las cabezas, y a los embriones mayores de E-12 se les enuclearon los ojos, tanto a unos como a otros se les sumergió en paraformaldehído 4% en fosfato 0.1M buffer a pH 7,6

Los especímenes permanecieron inmersos en fijador durante 1 día a temperatura ambiente. Una vez fijados se procedió a realizar el proceso de crioprotección en pasos sucesivos de sacarosa al 15% y 30% durante 24 horas cada paso, para posteriormente, ser incluidas las muestras en un medio de inclusión para criostato Tissue-tex y congelarlos mediante inmersión en nitrógeno líquido.

Las secciones en criostato se realizaron a un grosor entre 10 y 20 μ en dos planos para cada estadio. El plano transversal, útil para el estudio de los gradientes central a periférico y dorsal a ventral y el plano perpendicular a éste para el estudio de los gradientes central a periférica y temporal a nasal. Secciones pasando por diferentes áreas retinales se

montaron sobre portas cubiertos de gelatina y se almacenaron a 60°C hasta el momento de la inmunorreacción

Para la técnica inmunohistoquímica, se utilizaron dos grupos de embriones. En uno de ellos se utilizó como primer anticuerpo un anti glutamina sintetasa (Transductin Laboratories ref. G45020) y como segundo un anti mouse IgG marcado con isocianato de fluoresceina (Sigma). En el segundo grupo se utilizó como primer anticuerpo 3CB2 y como segundo un anti mouse IgM conjugado con isocianato de fluoresceina (Sigma).

3CB2 es un anticuerpo monoclonal que se expresa en células derivadas del ectodermo y mesodermo. Estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos indican que el antígeno reconocido por el anticuerpo es una proteína citoplásmica de 55 Kda que podría ser una proteína asociada a filamentos intermedios.

Los portas con los cortes de tejido se preincubaron en suero de pollo al 10% en PBS con triton X-100 al 0,25% durante 30 minutos y posteriormente se incubaron en el primer anticuerpo, a una dilución 1/200 en PBS con 0,1% de triton X-100 y 1% suero de pollo, durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 15 minutos cada uno en PBS con triton X-100 al 0,1% y suero de pollo al 1%, las secciones fueron incubadas con el segundo anticuerpo marcado con fluoresceina a una dilución de 1/100 en PBS con 0,1% de triton X-100, durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 minutos en PBS con

triton X-100 al 1% se procedió a cubrir los portas con una disolución de PBS-glicerol 1/9.

Se procesaron secciones de control tanto para los experimentos de marcaje simple como doble. La solución utilizada para bloquear la tinción no específica sustituyó tanto los anticuerpos primarios como los secundarios.

Las observaciones se realizaron en un microscopio Zeiss Axioplan con equipo de epifluoresceina y con cámara fotográfica incorporada. Las fotografías de fluoresceina se realizaron con una película de 400 ASA TMAX de Kodak.

5. RESULTADOS

I.- RESULTADOS DE MICROSCOPIA OPTICA

Los resultados que hemos obtenido mediante microscopía lumínica ponen de manifiesto que la administración de GLU actúa sobre la retina en diferenciación, provocando cambios degenerativos que afectan al desarrollo celular tanto de estirpes de naturaleza neuronal como glial. Dichas alteraciones no se manifiestan en los embriones tratados con MEL y se muestran muy atenuadas en los embriones a los que se administró MEL+ GLU (Figs.: 1,2, 3,4,5,6 y 7).

Así, en las observaciones realizadas sobre cortes semifinos de aquellos embriones que inyectamos a los 2 días de incubación (E-2) y sacrificamos a los 13 días de desarrollo (E-13), dos hechos llaman la atención al comparar la morfología presentada por las retinas del grupo control (Fig.1: a) con las del grupo experimental inyectadas con GLU (Fig.1: b, d). De una parte, las numerosas picnosis celulares que afectan fundamentalmente a pericarios de células que se hayan ubicadas en la mitad más interna de la retina (Figs. 1b y 1d: flechas). Si bien la localización de las picnosis se corresponden, en su mayor número, al tercio interno de la capa nuclear interna (Figs. 1b y 1d: CNI, flechas), también pueden observarse a nivel de la capa de células ganglionares (Figs. 1b y 1d: CG, flechas). De otra, la diferente estructuración que muestra la glía radial de la retina, la cual se manifiesta tanto por su distinta apetencia tintorial como por la conformación de la propia membrana limitante interna. Así, las retinas control de 13 días de desarrollo, muestran en el límite externo del tercio medio de la capa nuclear interna, pericarios de células con formas

poligonales y mayor densidad tintorial que el resto de las neuronas; éstos se corresponden con células de Müller (Fig. 1a:M, flechas). La mayor densidad de estas células gliales se pierde en las retinas de los embriones tratados con GLU (compárese Fig. 1a:M, flechas con Figs. 1b y 1d: M, flechas). A su vez, mientras que en los embriones control, los pies de las células de Müller conforman con nitidez la membrana limitante interna, en las retinas tratadas con GLU, la membrana limitante interna aparece desdibujada sobre una adelgazada capa de fibras del nervio óptico (compárese Fig 1a: MLI, CFN con Figs 1b y 1d).

Estos resultados se hacen aún más evidentes en las retinas de los embriones experimentales tratados con AAA y sacrificados en idénticos estadíos del desarrollo (E-13), que recogemos en la figura 1c. En ella observamos como la desestructuración selectiva inducida sobre las células de Müller por este análogo del GLU, se traduce por un elevado número de imágenes picnóticas en la mitad interna de la capa nuclear interna (Fig 1c: flechas) y por una degeneración masiva de la capa de células ganglionares, que prácticamente llega a desaparecer por completo (Fig 1c: CG) quedando la reducida capa plexiforme interna casi en contacto directo con los pies de las células de Müller, en la membrana limitante interna (Fig. 1c: CPI, MLI).

Los resultados que obtuvimos de los embriones experimentales tratados con MEL (Fig 1f) y MEL+ GLU (Fig. 1e) ponen de manifiesto, como a los 13 días de incubación (E-13), la morfología de las diferentes capas de la retina es totalmente similar a la presentada por los embriones del grupo

control, incluso en la observación de algunas células amacrinas invertidas en proceso de migración a través de la capa plexiforme interna (compárese Fig 1c con Figs 1e y 1f: cabezas de flechas).

Las retinas de los embriones de pollo tratadas con GLU a los 6 días de incubación (E-6) y sacrificadas a los 20 días de desarrollo (E-20) no manifiestan, en la observación que hemos efectuado al microscopio óptico sobre cortes semifinos (Fig.2f), alteraciones significativas en los estratos celulares situados externamente con respecto a la capa plexiforme interna, siendo por tanto la configuración de sus capas nuclear externa, plexiforme externa y nuclear interna (Fig.2f: CNE, CPE, CNI) muy similar a la presentada por los embriones control que sacrificamos en el mismo estadio (Fig. 2a: CNE, CPE, CNI). Sin embargo, si hemos podido observar claros signos de degeneración citológica en el tercio interno de la retina (comparese figuras 2a y 2f: CPI, CG, CFN). Así, llama la atención, como la capa de células ganglionares de este grupo de embriones experimentales (Grupo GLU), aparece en las secciones semifinas, como un estrato poco organizado cuyos pericarios, fuertemente contrastados, se encuentran rodeados por espacios extracelulares muy dilatados (Fig. 1f: CG, flechas gruesas) que también se hacen evidentes a nivel de la propia capa plexiforme interna y capa de fibras del nervio óptico, cuyo grosor se encuentra además sensiblemente reducido (Fig. 1f: CPI, CFN, flechas finas).

Las retinas de los embriones experimentales que fueron inyectados con AAA y sacrificadas en los mismos estadios que los del grupo GLU,

muestran los mismos signos de degeneración que estos últimos a nivel de su tercio interno. No obstante, la pérdida de densidad tintorial en el tercio más interno de su capa nuclear interna, es en ellos aún más acusada (comparese figuras 1c y 1f: CNI, CPI, CG, CFN).

Los datos aportados por la observación que hemos efectuado de aquellos embriones a los que se les administró MEL o MEL+GLU, a los 6 días de incubación (E-6) para ser sacrificados a los 20 días de desarrollo (E-20), quedan recogidos en las fotografías de las secciones semifinas que mostramos en las figuras 2b y 2d, 2e, respectivamente. En ellos destaca como la morfología celular y la estructuración de la retina de los embriones del grupo experimental MEL, fue en todo momento similar y concordante con la de los embriones control (comparese Fig. 2b con Fig. 2a: CNE, CPE, CNI, CPI, CG, CFN). Aunque, en las retinas de los embriones del grupo experimental MEL+GLU (Figs. 2d y 2e), la densidad tintorial de la capa de células ganglionares así como el espesor y maduración de la capa de fibras del nervio óptico, es muy similar a exhibida por los embriones control (comparese Figs. 2e y 2a: CG, CFN), podemos destacar la persistencia de signos degenerativos como son: la presencia de dilatados espacios extracelulares a nivel de la capa plexiforme interna y capa de células ganglionares (Fig. 2d: CPI, flechas y Fig. 2e: CG, flechas), que le otorgan un aspecto parecido a la presentada por los embriones experimentales tratados con glutamato (Grupo GLU).

Al observar las secciones verticales de retinas de embriones de pollo

tratados con GLU (E-2), y procesadas con técnicas de Golgi Stensaas y Colonier (Figs. 3,4 y 5), apreciamos un retraso considerable en el proceso de diferenciación neuronal, el cual se pone de manifiesto por la expresión morfológica que adoptan las expansiones de las células de Müller, así como por la alteración en la formación de los ramilletes dendríticos de las neuronas ganglionares y amacrinas.

Las figuras 3a-3f, correspondientes a retinas del grupo control, muestran las variaciones morfológicas que experimenta la célula de Müller durante el proceso de diferenciación celular. En ellas podemos apreciar como entre los 8 (E-8) y 9 días (E-9) de incubación (Figs. 3a y 3b), las formas que expresan las citadas células son de tipo bipolar casi liso. A partir de este estadio, la célula de Müller comienza a emitir espículas de disposición radial en su prolongación interna (Fig. 3b), a la vez que engruesa y estrecha su citoplasma en los niveles más externos (Fig.3c; flecha y cabeza de flecha). Hacia los 13 días de incubación (E-13), la célula de Müller exhibe unas características morfológicas de gran parecido a las formas que posee la retina del pollo adulto (Figs. 3d y 3e). El segmento externo de estas células está prácticamente diferenciado, en tanto que el interno se encuentra más retrasado, pues el ramillete de expansiones está creciendo en dirección vítrea (Fig. 3d: flechas). Uno o dos estadios más tarde, el proceso de diferenciación prácticamente ha concluido (Fig. 3f).

Las retinas de los embriones de pollo inyectadas con GLU (figs. 3g-3j) a los 2 días de incubación (E-2), y sacrificadas a los 12 y 13 días de

desarrollo (E-12; E-13), muestran unas células de Müller cuyas características morfológicas se corresponden con la exhibida por la de los embriones del grupo control a los 8 (E-8) y 9 (E-9) días de incubación. Este hecho se ve corroborado por los siguientes datos:

1. La similitud morfológica que evidenciamos en el desarrollo de la prolongación externa entre los embriones del grupo experimental GLU, sacrificados en E-13, y los del grupo control sacrificados en E-9 (comparese Figs. 3g, 3h y 3i: cabezas de flecha con Figs. 3c: cabeza de flecha, respectivamente). A su vez, a nivel de la capa plexiforme externa, la inflexión que realiza esta prolongación glial en las retinas experimentales tratadas con GLU (Figs. 3h y 3j: flechas finas), es idéntica a la que observamos en las retinas de los embriones control que sacrificamos en E-8 (Fig.3a: flecha fina).

2.- El desarrollo de la prolongación interna de las células de Müller de las retinas de embriones tratados con GLU, sacrificados en E-12 y E-13 (Figs. 3g-3j), es también similar al que muestran las retinas del grupo control sacrificados en E-8 y E-9 (Figs. 3a y 3b).

En algunos de los embriones tratados con GLU, no es infrecuente observar imágenes como las que mostramos en las figuras 3g y 3h (flechas huecas). Estas representan el estadio final de un proceso degenerativo, que comienza siempre por un engrosamiento citoplásmico y terminan con la rotura de la fibra o del citoplasma de la célula afectada.

Las técnicas de impregnación argéntica, nos revelan claramente que los efectos morfológicos más acusados que el GLU produce en la diferenciación de la retina, se localizan en las células amacrinas (Figs. 4f-4k) y en las células ganglionares (Figs. 5d-5g). Estas experimentan un manifiesto retraso en su proceso de diferenciación, cuando se las compara con la morfología que exhiben los diversos tipos de células amacrinas y ganglionares, correspondientes a embriones del grupo control (Figs. 4a-4e y 5a-5c, respectivamente), sacrificadas en el mismo estadio del desarrollo (E-12; E-13).

Así, en la figura 4h podemos apreciar varias células bipolares y una célula amacrina que aún no ha retraído su prolongación escleral (Fig. 4h: cabeza de flecha), y tampoco ha diferenciado su prolongación interna a nivel de la capa plexiforme interna. Observese como, en los embriones control (Fig.4a), las células amacrinas carecen ya de prolongación externa, a la vez que su prolongación interna ha comenzado a diferenciarse.

En las figuras 4f y 4i, las cabezas de flecha señalan la atrofia de los ramilletes dendríticos de dos células amacrinas del primer estrato. El resto de las células amacrinas que se observan en las figuras 4g, 4j y 4k, también poseen escasas prolongaciones dendríticas, siendo la morfología que exhiben muy similar a la mostrada por los embriones del grupo control (Figs. 4c-4e) a los 8 días de incubación (E-8).

Del mismo modo, a nivel del estrato de células ganglionares, podemos apreciar la diferente morfología que exhiben los ramilletes

dendríticos de los embriones del grupo control (Figs. 5a y 5c: cabezas de flecha) , al ser comparados con la de los embriones experimentales tratados con GLU (Figs. 5d,5e,5g: flecha hueca). Estos últimos, poseen unos ramilletes dendríticos prácticamente atróficos o inexistentes. En ellas sólo se diferencia una prolongación escleral que parte del mismo polo de la célula y que se corresponde con un resto de la prolongación externa que unía la célula ganglionar a la membrana limitante externa (Figs. 5d, 5e y 5g: flecha hueca). En el mejor de los casos, las células ganglionares más diferenciadas que hemos podido encontrar, en los embriones tratados con GLU, muestra un ramillete de arborización dendrítica como el que recogemos en la figura 5f (cabezas de flecha).

Por último reseñar que, en los embriones control, algunas de las células ganglionares menos diferenciadas presentan en el inicio de su axón, próximo al pericario, un pequeño engrosamiento (Fig.5b: cabeza de flecha), el cual es mucho más manifiesto en las células ganglionares de los embriones tratados con GLU (Fig. 5e: cabeza de flecha).

El antígeno que reconoce el anticuerpo monoclonal 3CB2 se localiza durante el desarrollo en células gliales de Müller de la retina y en la población de células gliales que estructuran la papila, así como en la cabeza del nervio óptico. Los embriones control, inyectados en E-8 y sacrificados en E-14, muestran una expresión de 3CB2 (Fig. 6 a) idéntica a la que se identifica en embriones normales, no experimentales. Sin embargo, la inyección en globo ocular de GLU, anula completamente la expresión de

3CB2 en todas las células gliales de la retina y de la papila (Fig.6 b). Cuando la inyección de GLU se realiza en saco vitelino, comprobamos que el efecto es menor y todavía podemos apreciar alguna expresión de antígeno 3CB2 en la región interna de las células de Müller, siendo esta aún más intensa en las células gliales peripapilares (Fig. 6 c). Los resultados obtenidos en nuestros embriones experimentales del grupo MEL + GLU demuestran, como se recoge en la figura 6 d, que la administración de MEL previa a la inyección de GLU se traduce en una disminución del efecto nocivo del GLU o en una recuperación de la expresión del antígeno 3CB2. Aunque el patrón de expresión no es idéntico al de la normalidad, o al de los embriones control, se puede apreciar que las células de Müller expresan antígeno en toda su extensión, y vuelven a mostrar el gradiente de expresión más intenso en las zonas relacionadas con las capas profundas de la retina (Fig. 6 d). Las células gliales peripapilares y la cabeza del nervio óptico muestra una intensidad de marcaje muy parecida a la de los embriones control (Fig. 6 d).

3BA8 es un anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno que se expresa durante el desarrollo en células amacrinas y en las células gliales peripapilares de la retina del pollo. Los embriones del grupo control, inyectados en globo ocular y/o saco vitelino en E-8 y sacrificados en E-14, muestran una expresión de 3BA8 idéntica a la que se aprecia en los embriones procesados normalmente sin inyección experimental. Las figuras 7 a y 7 b, recogen estos datos y muestran la expresión del antígeno 3BA8

tras inyección en globo ocular (Fig. 7 a) e inyección en saco vitelino (Fig. 7 b), donde se puede observar una banda de marcaje que coincide con la ubicación de las células amacrinas de la retina (flechas). Del mismo modo observamos que las células gliales peripapilares aparecen intensamente teñidas formando una barrera entre la retina, la capa de fibras del nervio óptico, la cabeza del nervio óptico y el pecten (Figs. 7 a y b: cabezas de flechas).

La inyección de GLU en globo ocular, determina una ausencia completa de la expresión de 3BA8 en las poblaciones celulares anteriormente señaladas (Fig. 7 e). Cuando la inyección de GLU se efectúa en el saco vitelino, el efecto es menor y se aprecia un borramiento de la expresión de 3BA8 a nivel de las células amacrinas de la retina. Sin embargo, las células gliales peripapilares todavía muestran algo de expresión, sobre todo en la zona próxima al pecten (Fig. 7 c). La inyección conjunta de MEL + GLU demuestra que el efecto nocivo del GLU disminuye drásticamente, llegando a mostrar los embriones así tratados, una expresión de antígeno muy parecida a la de los embriones control (Fig. 7 d).

II.- RESULTADOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Los resultados que hemos obtenido con microscopía electrónica de transmisión en las retinas de los embriones experimentales a los que se les inyectó GLU a los 2 días de incubación (E-2) y se sacrificó a los 13 días de desarrollo (E-13), constatan los hallazgos obtenidos al microscopio lumínico,

a la vez que evidencian claros rasgos de degeneración citológica y retraso en la maduración neuronal. Si bien, es en las capas profundas de la retina donde dichas alteraciones se pueden apreciar con mayor claridad, el mayor poder de resolución del microscopio electrónico nos permite observar, como a nivel de las capas más externas, también se hacen sentir los efectos neurotóxicos del GLU (Figs. 9:a-f). Así, destaca la vacuolización que experimentan los pies de las células fotorreceptoras, a nivel de sus bases en el límite con la capa plexiforme externa (Figs. 9a y 9d: BR, asteriscos), mostrando a veces en su interior estructuras vesiculares similares a conos de crecimiento (Figs.9a: cc). El aspecto general de la capa plexiforme externa de los embriones tratados con GLU, muestra además un gran retraso en la organización ultraestructural de las expansiones neuronales que sinaptan a nivel de dicha capa, prueba de ello es la falta de formación de los segmentos internos de los fotorreceptores, así como la ausencia de estructuras sinápticas que marquen el comienzo de la sinaptogénesis en la capa plexiforme externa (Fig.9a:CPE). Estos últimos acontecimientos, en los embriones del grupo control sacrificados en el mismo estadio ya han comenzado a desarrollarse (Fig. 8a). Observese, como en la zona de transición entre las capas nuclear externa y plexiforme externa, las bases de los fotorreceptores se muestran como una matriz homogénea (Fig. 8a: CNE, BR, CPE), carente de las estructuras compatibles con conos de crecimiento y vacuolización, tan llamativas en los embriones tratados con GLU (comparese Fig. 8a con Figs. 9a y 9d).

Otro dato a destacar es la incidencia que la administración de GLU

produce sobre el desarrollo de la retina es la afectación de la capa nuclear interna. Así, en estos embriones que sacrificamos a los 13 días de incubación (E-13), podemos evidenciar como a nivel del tercio externo de la capa nuclear interna, algunas células horizontales ofrecen un aspecto degenerativo, claramente identificable por el borramiento de su membrana nuclear y vacuolización citoplásmica (Figs. 9b y 9c: asteriscos); fenómenos degenerativos hidrópicos que también son evidentes a nivel del citoplasma de las células bipolares y de las células de Müller (Figs. 9e y 9f: asteriscos, respectivamente).

La zona de la retina que presenta mayor número de picnosis celulares corresponde a los dos tercios internos de la capa nuclear interna. De esta forma, son las células gliales de Müller y las células amacrinas las que sufren, durante estos estadios iniciales de la diferenciación, la mayor mortalidad. Las fotografías que recogemos en la figura 10: a-f, las cuales se corresponden con retinas de embriones experimentales tratados con GLU al 2º día (E-2) y sacrificados al 13º día de incubación (E-13), constatan estos hechos. Así, en la figura 10a podemos apreciar una célula amacrina, identificada como tal por su ubicación en el límite más interno de la capa nuclear interna, en estadio picnótico (Fig. 10a: A); que se encuentra flanqueada, a ambos lados, por el citoplasma electrodensso y vacualizado de una célula de Müller (Fig.10a: M, asteriscos) y por un escombros celular, o restos necróticos del núcleo y degeneración hidrópica del citoplasma (Fig.10a: flecha gruesa y fina, respectivamente), de otra célula vecina.

Los fenómenos de muerte celular que afectan a las células

neuronales y gliales que conforman la capa nuclear interna pueden ser recogidos en distintas fases de su secuencia de formación (Figs. 10: b-f). Generalmente, el primer indicio en la formación de una picnosis, se caracteriza por el borramiento de la membrana nuclear que es seguido por una condensación de la cromatina con formación de imágenes heterogéneas o desestructuradas y vacuolización citoplásmica (Fig.10c), hasta acabar conformando una imagen nuclear totalmente electrondensa (Figs. 10b y 10d) y, finalmente, borramiento de los límites celulares dando lugar a las típicas imágenes de escombros celulares en las que aparecen grandes lagunas intercelulares ocupadas por restos de materiales de células picnóticas (Fig.10f).

En las figuras 11 a-e recogemos las lesiones degenerativas más importantes inducidas por la administración de GLU, que hemos observado durante los primeros estadios de la diferenciación neuronal de la retina (E-13). Así, la figura 11a recoge la degeneración vacuolar de las bases de los fotorreceptores(BR); en la figura 11b destaca la ausencia total de imágenes sinápticas a nivel de la capa plexiforme interna que, lejos de presentar formaciones sinápticas como las que detectamos en los embriones control sacrificados en el mismo estadio (E-13) y en los que las barras sinápticas se encuentran rodeadas por numerosas vesículas (Fig.8b: CPI, flecha gruesa, flecha, respectivamente), se caracteriza por la presencia de axones o conos de crecimiento degenerados (Fig,11b: flecha hueca). En la figura 11c se aprecia una célula intraplexiforme (i) como fiel exponente del retraso en la migración neuronal; y por último, la gran degeneración que sufre la glia

radial de la retina representada por la célula de Müller (Fig. 11d: M), así como la muerte neuronal que afecta predominantemente a los estratos más profundos de la retina, la cual recogemos en la figura 11e, donde mostramos una célula ganglionar en fase picnótica (Fig. 11e: G).

Nuestros resultados ponen de manifiesto que los efectos neurotóxicos inducidos por el GLU se atenúan cuando, previamente a su administración a los 2 días de incubación (E-2), inyectamos MEL. De esta forma, en los embriones del grupo experimental MEL+ GLU que fueron sacrificados a los 13 días de desarrollo (E-13), podemos apreciar como en la morfología ultraestructural de las capas internas de la retina, los únicos vestigios que quedan de la inyección de GLU se reducen a la presencia de espacios extracelulares agrandados y escasas prologaciones de aspecto degenerado a nivel del tercio interno de la capa nuclear interna (Figs. 12a: CNI, asteriscos, flecha gruesa, respectivamente; y Fig. 12c), sin que en ningún momento hallamos podido detectar los fenómenos de muerte celular de neuronas amacrinas o ganglionares y células gliales de Müller (Figs. 10a; 11e:G y 11 d: M) que eran tan evidentes y masivos, en estos estadios del desarrollo, en las retinas de aquellos embriones experimentales a los que únicamente se les administró GLU. Asimismo, destaca el empaquetamiento axonal que muestra la capa de fibras del nervio óptico, en la que tampoco se aprecian hallazgos de naturaleza degenerativa y cuya conformación ultraestructural está acorde con el estadio del desarrollo en la que dichos embriones fueron sacrificados (Fig. 12b: CFNO, cabezas de flechas).

El efecto neurotóxico que, sobre la diferenciación de la retina del embrión de pollo, conlleva la administración de GLU en estadios iniciales del desarrollo (E-6), se hace más patente en la observación ultraestructural de la retina cuando estos son sacrificados en estadios perinatales, como son los 20 días de incubación (E-20). Una vez más, es a nivel de la capa plexiforme interna, capa de células ganglionares y capa de fibras del nervio óptico, donde las alteraciones inducidas por el GLU se manifiestan con mayor intensidad (Figs 13a y 13b).

Dos hallazgos muy evidentes, destacan en la observación de la capa plexiforme interna de nuestros embriones experimentales, cuando la comparamos con la del grupo de embriones control, sacrificados en el mismo estadio (E-20). Así, nos llama la atención el gran número de espacios extracelulares dilatados (Fig.13a: CPI, flechas), que podemos evidenciar en su espesor en los embriones experimentales, otorgándole un aspecto laxo e inmaduro, que contrasta con la ultraestructura exhibida por los embriones del grupo control, caracterizada por un entramado fibrilar fuerte y compacto en el que no existen espacios extracelulares (Fig. 8e: CPI). A su vez, mientras que en las retinas de los embriones control, la sinaptogénesis de la capa plexiforme interna es ya muy evidente, con multitud de sinapsis en barra; en la capa plexiforme interna de los embriones a los que se trató con GLU, no se evidencian ni siquiera primitivas formaciones de contactos sinápticos, indicativos del inicio de su sinaptogénesis (comparese Fig. 8d: CPI, s, flecha con Fig. 13a:CPI).

El estrato de células ganglionares también se muestra alterado por los efectos del GLU. Así, los espacios extracelulares son muy numerosos y de gran calibre, localizándose a veces en su interior estructuras compatibles con conos de crecimiento (Fig.13a: CG, asteriscos, flecha fina). Además, la desestructuración citoplásmica que acompaña a la gran electrónica nuclear, otorga a algunas de estas células ganglionares el aspecto degenerado y necrótico característico del patrón de muerte celular necrótica o picnótica (Fig.13a: P).

La capa de fibras del nervio óptico de las retinas tratadas con GLU, ofrece unas imágenes ultraestructurales que muestran, claramente, el gran retraso y neurotoxicidad que induce el GLU en estos niveles de la retina (Figs. 13a y 13b), cuando se la compara con la de los embriones control sacrificados en el mismo estadio del desarrollo (Figs. 8e,8f y 8g). De esta forma, en los embriones experimentales, se pierde el típico empaquetamiento axonal tan característico de este estrato fibrilar en estadios perinatales, que en estos casos está sustituido por la presencia de abundantes espacios extracelulares, algunos de los cuales, se encuentran ocupados por conos de crecimiento (comparese Figs.13a: CFN,cc y Fig.13b con Figs. 8e y 8g: CFN, a). También de gran significado patológico nos resulta el hecho de que, en ningún momento, hayamos observado axones mielinizados en dicha capa. Este hallazgo es suficientemente llamativo si comparamos las figuras 13a y 13b (CFN) de retinas experimentales, con las figuras 8f (m) y 8g (a) que corresponden a retinas de embriones control de 20 días de incubación (E-20), en las que la presencia de axones mielínicos,

en vecindad con los pies de las células de Müller (Figs. 8f y 8g: M), son muy manifiestos.

El efecto neuroprotector que la MEL ejerce sobre las lesiones degenerativas inducidas por el GLU, se manifiestan en las retinas de los embriones del grupo experimental MEL+GLU (Figs.14a-14c y 15), que inyectamos a los 6 días de incubación (E-6) y sacrificamos a los 20 días de desarrollo (E-20), por presentar un patrón ultraestructural muy similar al exhibido por los embriones del grupo control sacrificados en el mismo estadio del desarrollo (Figs. 8c-8f); de manera que es sólo a nivel de la capa de células ganglionares y capa de fibras del nervio óptico (Fig.15:CG, CFN), donde hemos podido encontrar algunos signos degenerativos comparables a los evidenciados, en estas capas interna de la retina, en los embriones del grupo experimental GLU (Fig.13a).

El fotomontaje de la figura 14a recoge la morfología ultraestructural de las capas más externas de la retina; en él podemos apreciar una imagen muy típica del desarrollo normal de la retina perinatal, como son los segmentos externos de las células fotorreceptoras, cuyos somas se ubican a nivel de la capa nuclear externa, prolapsándose fuera de la membrana limitante externa (Fig.14a: MLE, CNE). No obstante, es a nivel del tercio externo de la capa plexiforme externa, y más concretamente en las bases de los fotorreceptores, donde con más claridad podemos apreciar el efecto neuroprotector de la MEL (Fig. 14a: CPE y Fig. 14b: BR), siendo muy frecuente el hallazgo de sinapsis en barra (Fig.14b: flechas) cuyas

invaginaciones sinápticas, tal y como sucede en los embriones control (Fig.8c: flecha), se encuentra ocupada por las prolongaciones postsinápticas de las células bipolares y de las células horizontales, constituyendo diadas o triadas sinápticas. Otros datos a destacar son: la ausencia de degeneración vacuolar en las bases de los fotorreceptores y el entramado denso y compacto, carente de espacios extracelulares agrandados, que muestra la capa plexiforme externa de estos embriones (Fig. 14b: BR y 14a: CPE, respectivamente).

Si bien es en la conformación de las capas profundas de la retina, donde el patrón ultraestructural de los embriones del grupo MEL+GLU sacrificados a los 20 días (E-20), manifiesta ciertos rasgos degenerativos atribuibles a la neurotoxicidad glutamatérgica como es, por ejemplo, la vacuolización citoplásmica que experimentan las células ganglionares (Fig. 15: CG, asteriscos), el hecho de que no hallamos podido evidenciar fenómenos de muerte celular y/o el abundante empaquetamiento axonal, observado en la capa de fibras del nervio óptico, algunos de los cuales presentan envoltura mielíca (Fig.15: CFN, a), unido a la drástica reducción del número de espacios extracelulares que hemos evidenciado en esta capa, hablan por sí sólo del efecto neuroprotector que produce la MEL cuando es administrada previamente a la inyección de GLU.

Por último señalar, que dicho efecto regenerador también se manifiesta a nivel de la capa plexiforme interna. Así, en los embriones del grupo MEL+GLU sacrificados a los 20 días (E-20), no hemos evidenciado los dilatados espacios extracelulares que si observábamos en los embriones

tratados con GLU (comparese Fig.15: CPI con Fig. 13a: CPI, flechas), siendo su entramado fibrilar así como desarrollo sináptico (Fig.14c: flechas) muy similar al que hemos podido observar en los embriones del grupo control, sacrificados en dicho estadio (Fig.8e: CPI y Fig 8d: CPI, s flechas).

6. ICONOGRAFIA

Figura 1:

Fotografías de las secciones verticales de retina de los cortes semifinos correspondientes a los embriones del grupo control **(a)**, y a los grupos experimentales GLU **(b y d)**, AAA **(c)**, MEL +GLU **(e)** y MEL **(f)**, inyectados a los 2 días de incubación (E-2) y sacrificados a los 13 días de desarrollo (E-13). CNE: capa nuclear externa. CPE: capa plexiforme externa. CNI: capa nuclear interna. CPI. Capa plexiforme interna. CG: capa de células ganglionares. CFN: capa de fibras del nervio óptico. MLI: membrana limitante interna. M flecha: pericario de célula de Müller. Flechas: picnosis celulares. Cabezas de flecha: células amacrinas invertidas en proceso de migración. X 400.

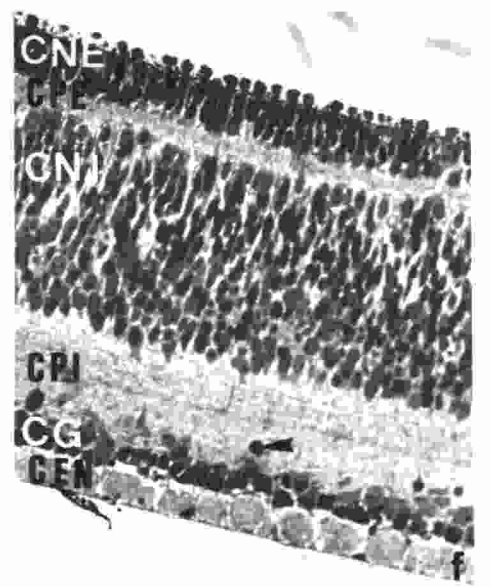
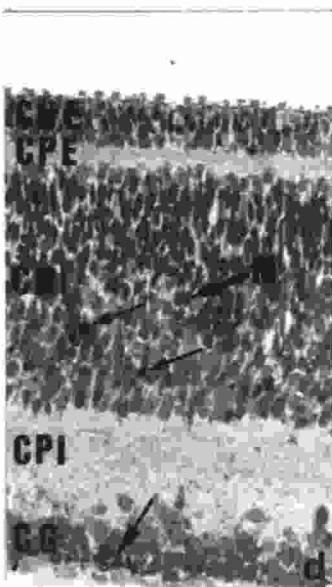
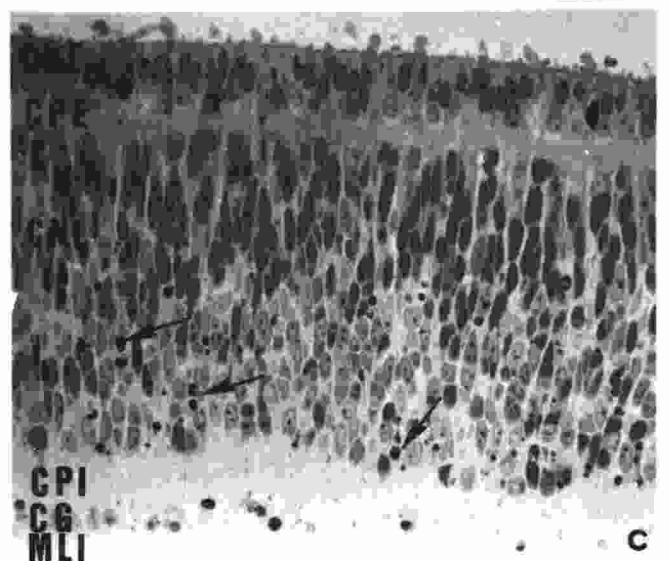
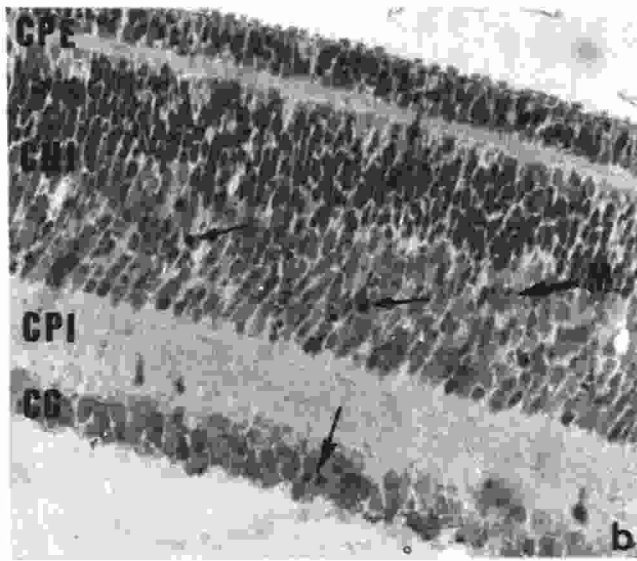
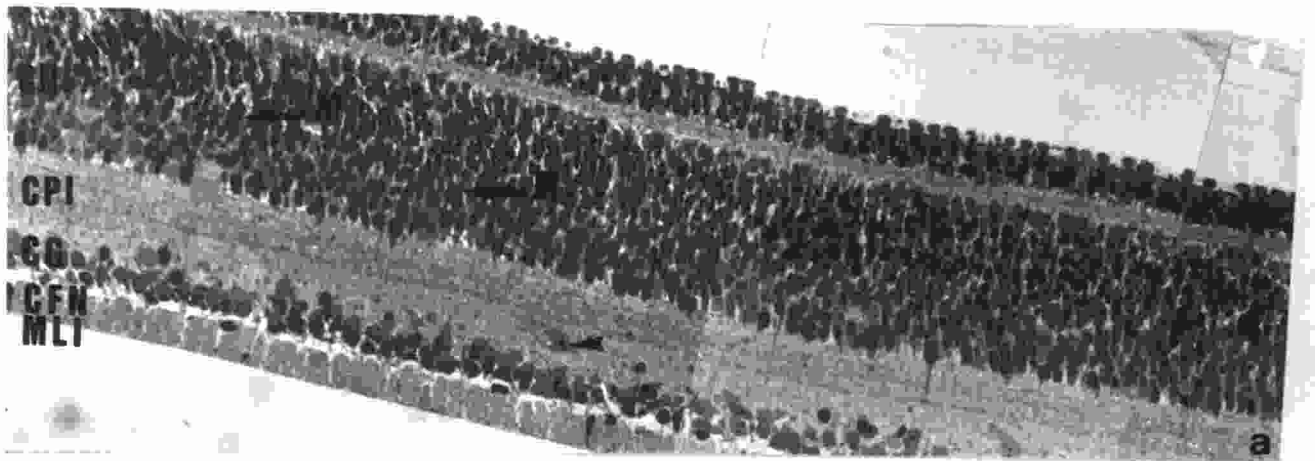


Figura 2:

Fotografías de las secciones verticales de retina correspondientes a los cortes semifinos de los embriones del grupo control **(a)** y a los grupos experimentales MEL **(b)**, AAA **(c)**, MEL+ GLU **(d y e)** y GLU **(f)**, inyectados a los 6 días de incubación (E-6) y sacrificados a los 20 días de desarrollo (E-20). CNE: capa nuclear externa. CPE: capa plexiforme externa. CNI: capa nuclear interna. CPI. Capa plexiforme interna. CG: capa de células ganglionares. CFN: capa de fibras del nervio óptico. Obsérvese la presencia de espacios extracelulares a nivel de la CPI **(d,e,f: flechas)** y la vacuolización citoplásmica de las células ganglionares **(e,f: flechas)**. **a-d x 400. e-f x 1000**

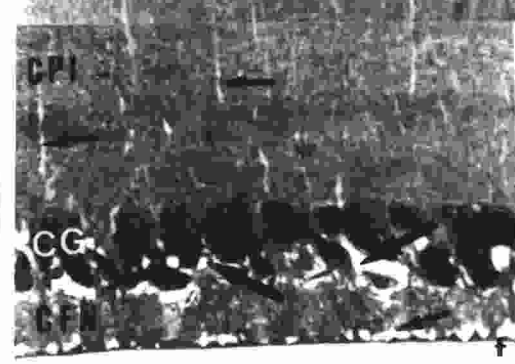
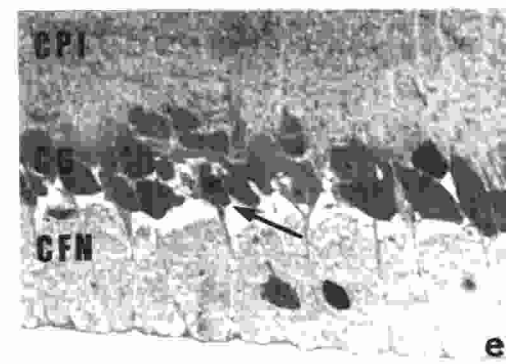
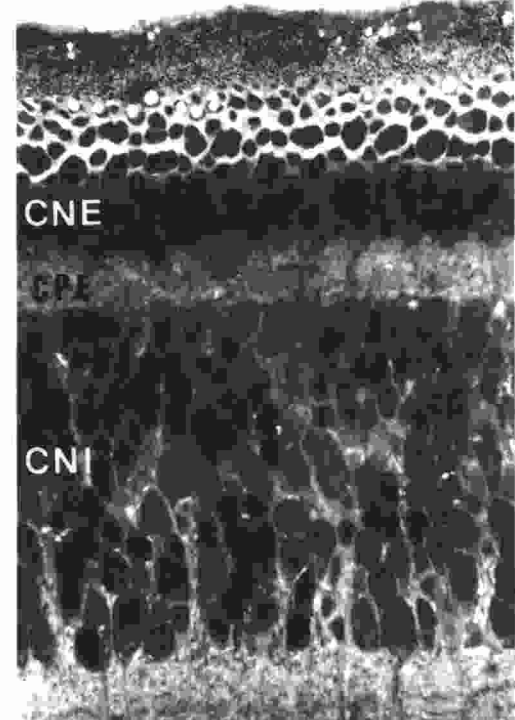
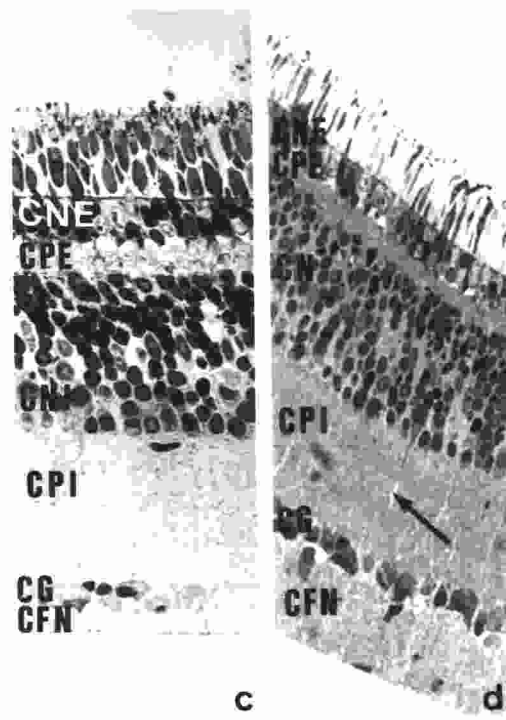
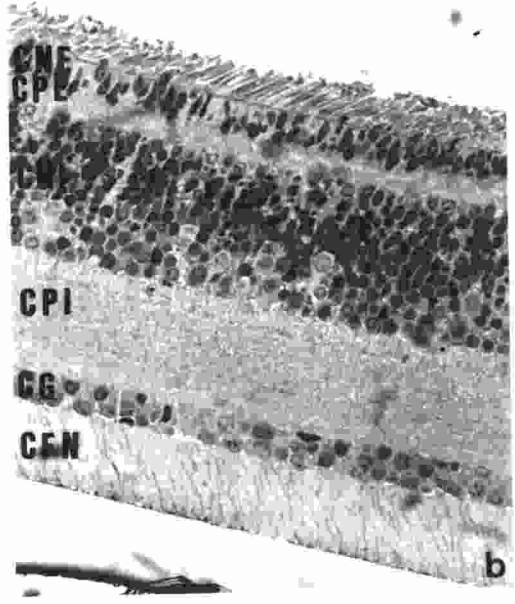
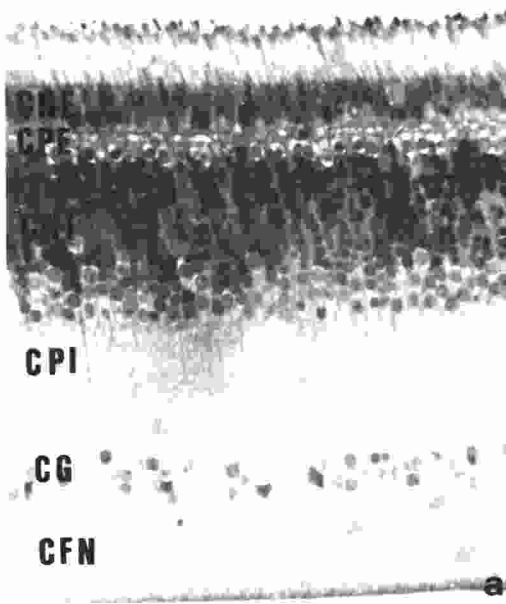


Figura 3:

Morfología de las células de Müller en los embriones del grupo control durante los estadios E-8 (**a**), E-9 (**b y c**), E-13 (**d y e**) y E-15 (**f**) del desarrollo. Observese el estrechamiento citoplásmico que experimenta la prolongación externa (**c**: flecha y cabeza de flecha, respectivamente) en los estadios iniciales del desarrollo. En estadios más avanzados, destaca la presencia de un ramillete de expansiones que crecen en dirección vítrea desde la prolongación interna (**d**: flechas). X400

Morfología de las células de Müller en los embriones del grupo experimental GLU (**g-f**) durante los estadios E-12 y E-13 del desarrollo. Las cabezas de flecha señalan la prolongación externa. Las flechas finas marcan la inflexión de la prolongación externa a nivel de la capa plexiforme externa. Las flechas huecas indican el engrosamiento citoplásmico y rotura fibrilar de una prolongación externa degenerada. X 400.

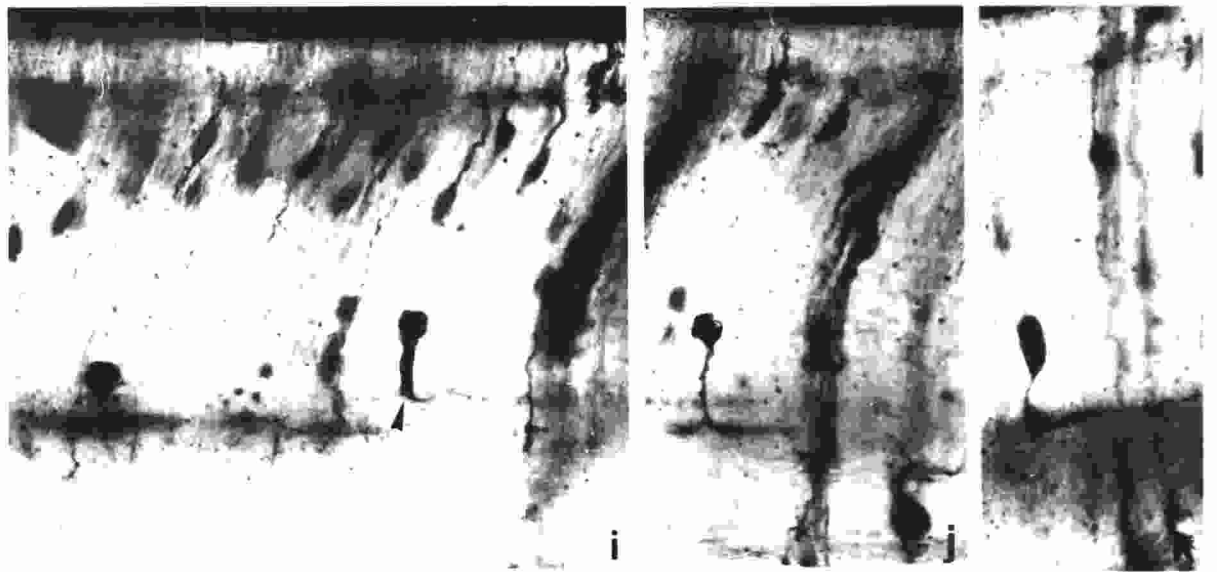
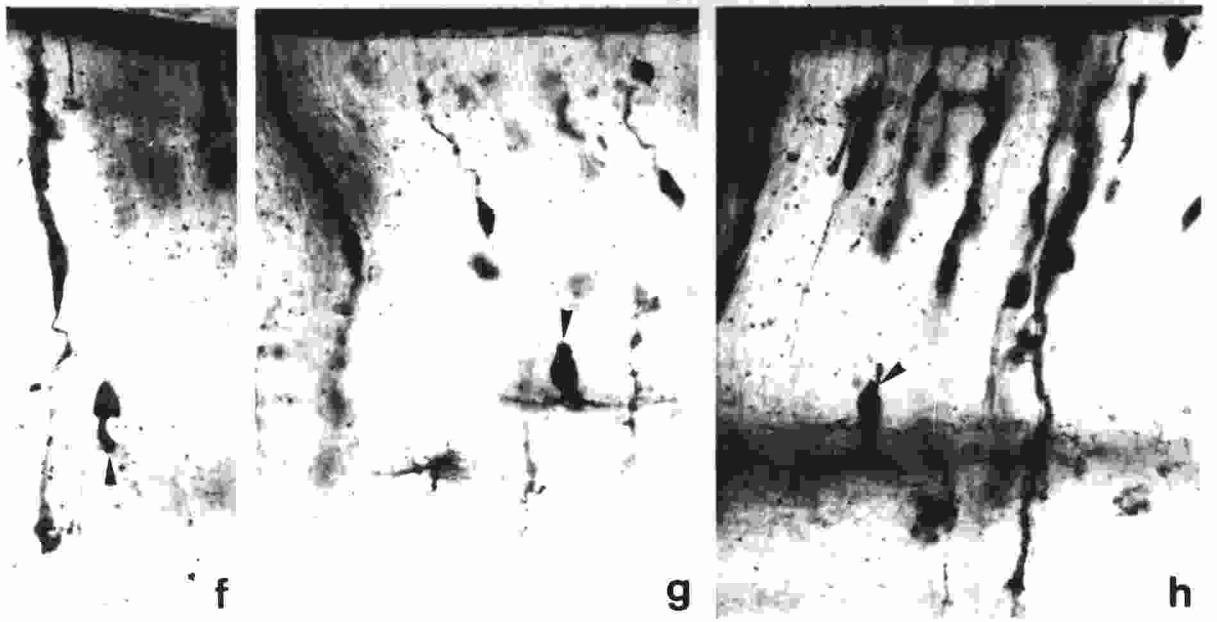
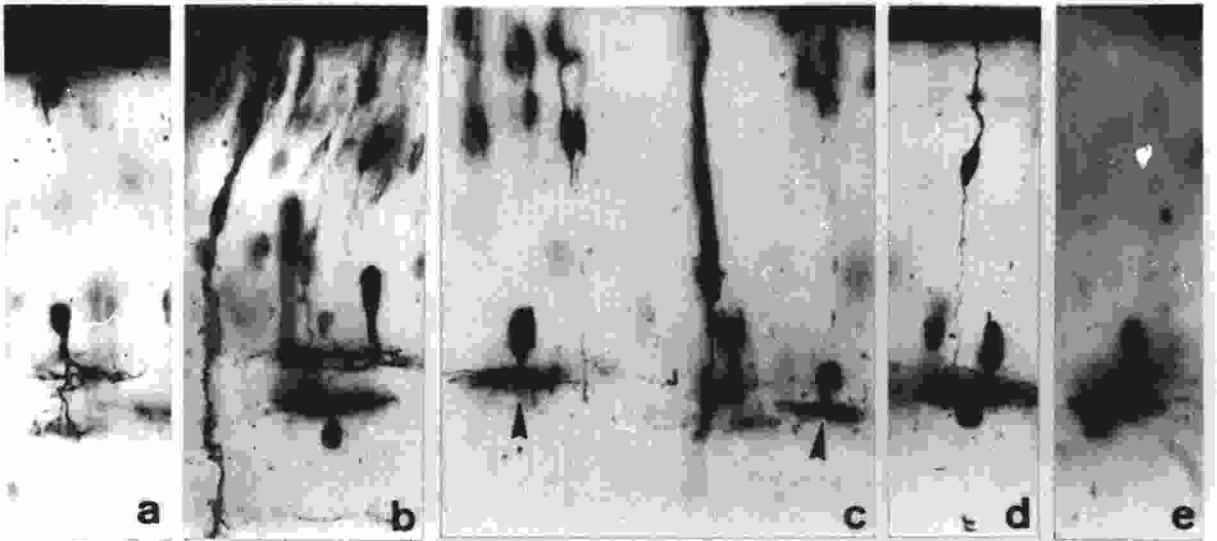


Figura 4:

Morfología de las células amacrinas de la retina correspondientes a embriones del grupo control, durante los estadios E-8 **(c,d,e)** y E-12, E-13 **(a,b)** del desarrollo. Las cabezas de flecha señalan las prolongaciones dendríticas en estadios iniciales de su diferenciación. x400

Morfología de las células amacrinas de la retina correspondientes a embriones experimentales tratados con GLU **(f-j)**, durante los estadios E-12, E-13 del desarrollo. Observe la atrofia de los ramilletes dendríticos **(f,i: cabezas de flecha)** y la presencia de prolongaciones externas que aún no se han retraído **(g-h: cabezas de flecha)** x 400.

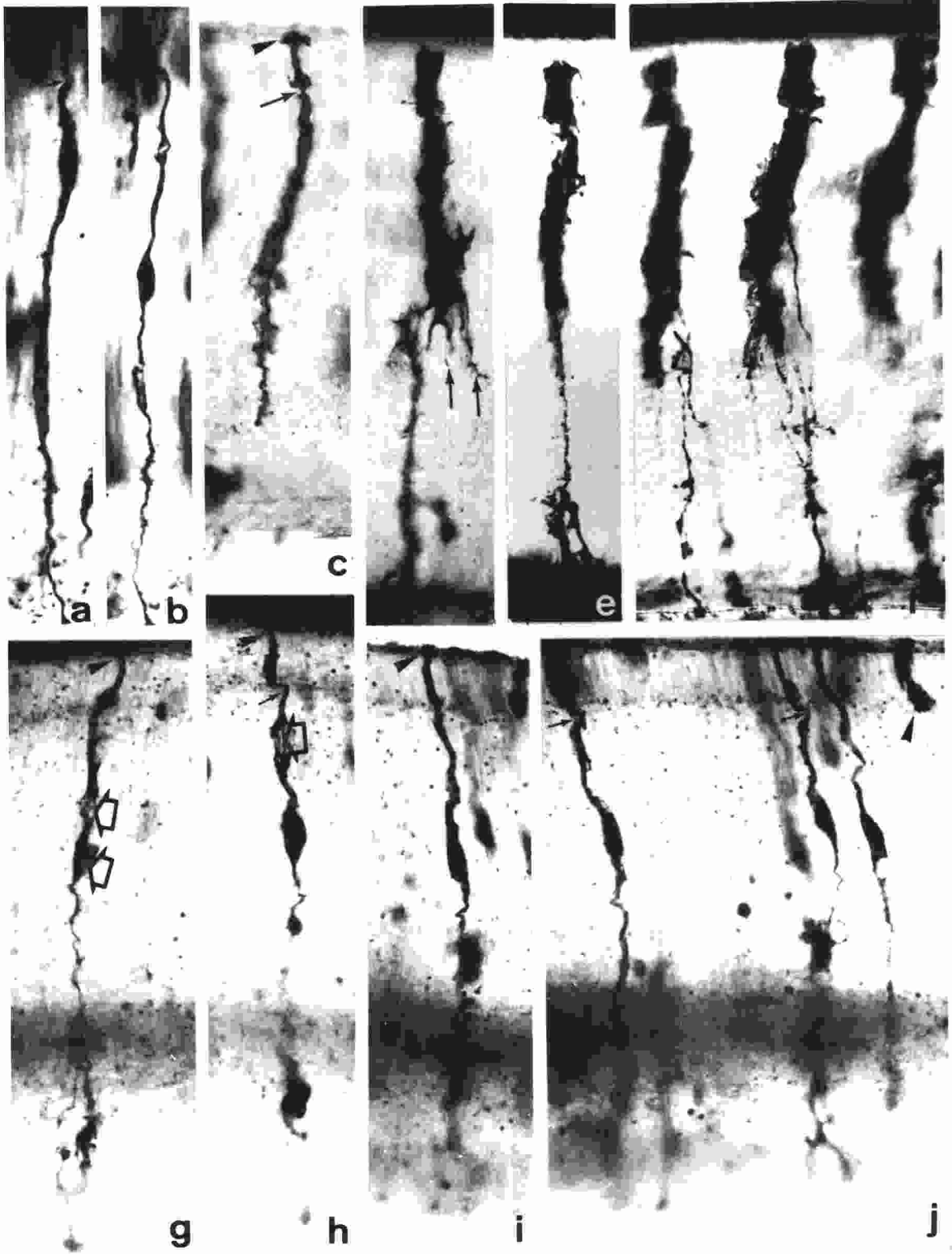


Figura 5:

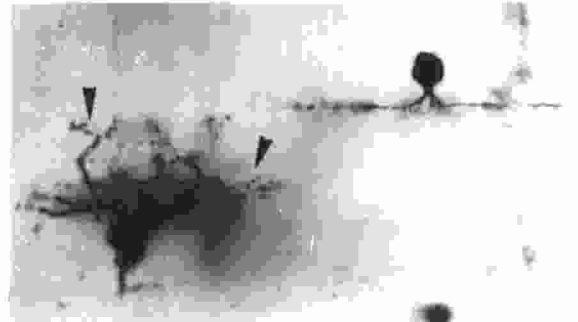
Morfología de las células ganglionares de la retina durante los estadios E-12, E-13 del desarrollo, correspondientes a embriones del grupo control (**a-c**) y experimentales tratados con GLU (**d-g**). Las cabezas de flechas de las figuras **a** y **c** señalan los ramilletes dendríticos de células ganglionares normales, compárese con la atrofia que estos muestran en las células ganglionares de embriones tratados (**d, e, g**: flechas huecas y **f**: cabezas de flecha). Observe el engrosamiento que muestra la porción inicial del axón en células normales (**b**: cabeza de flecha) y compárese con el aspecto aún más indiferenciado que este presenta en células tratadas (**e**: cabezas de flecha). X 400.



a



b



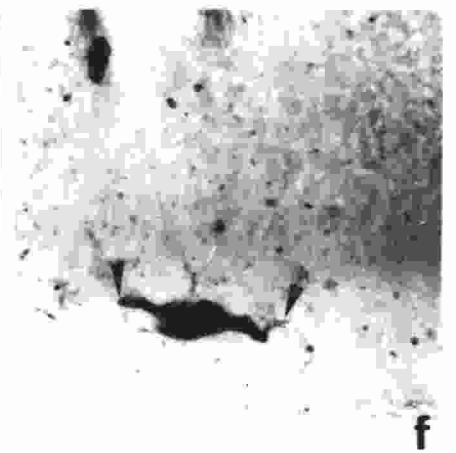
c



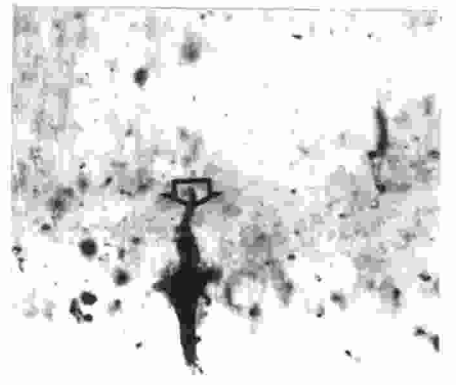
d



e



f



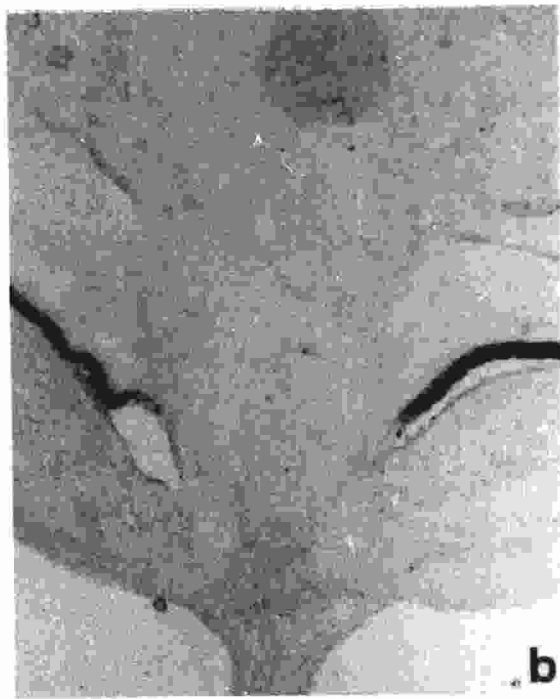
g

Figura 6:

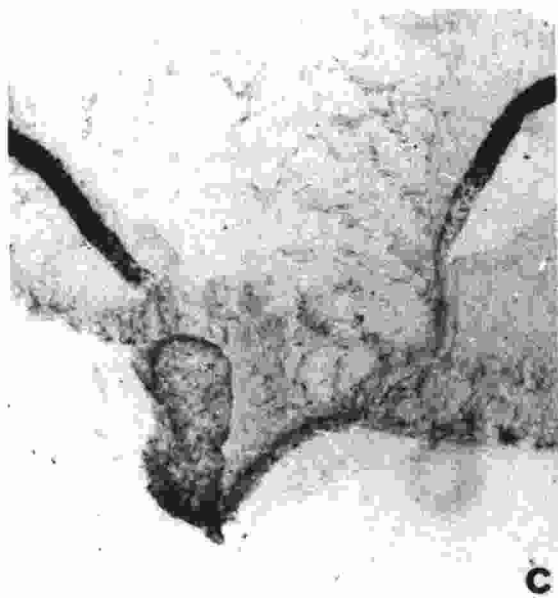
Secciones verticales de retina mostrando la expresión de 3CB2 en embriones de pollo inyectados en E-8 y sacrificados en E-14. **a:** Embriones control. **b:** Embriones inyectados con GLU intraocularmente. **c:** Embriones inyectados con GLU en saco vitelino. **d:** Embriones inyectados con MEL+ GLU. X 200.



a



b



c



d

Figura 7:

Secciones verticales de retina mostrando la expresión de 3BA8 en embriones de pollo inyectados en E-8 y sacrificados en E-14. **a:** Embriones control inyectados intraocularmente. **b:** Embriones control inyectados en saco vitelino. **c:** Embriones inyectados con GLU en saco vitelino. **d:** Embriones inyectados con MEL+GLU. **e:** Embriones inyectados con GLU intraocularmente. Obsérvese el marcaje de las células amacrinas de la retina (flechas) y de las células peripapilares (Cabezas de flechas). X 200.

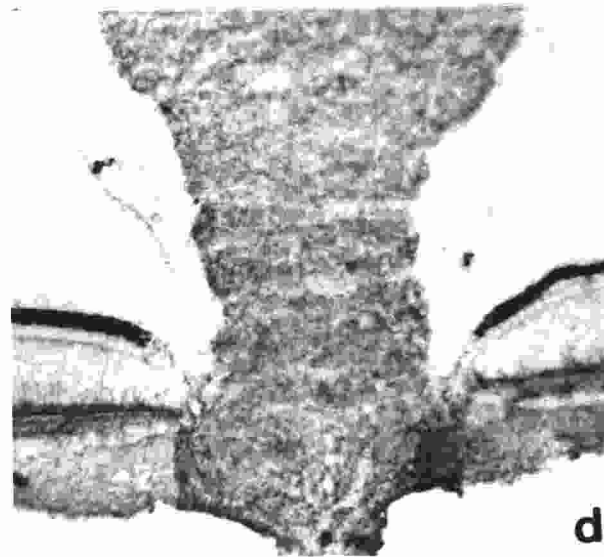
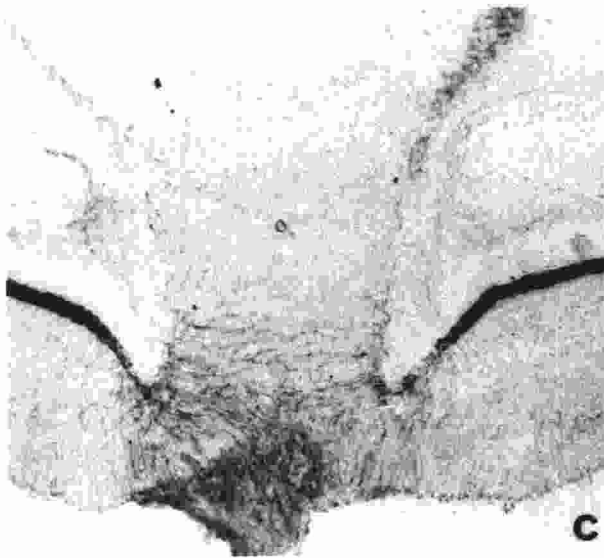
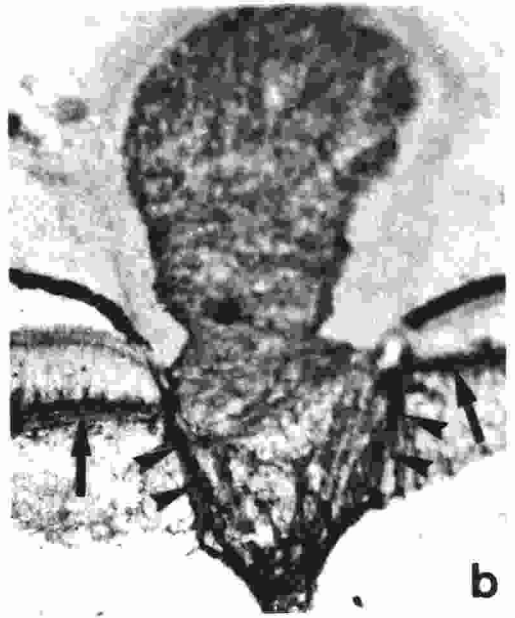
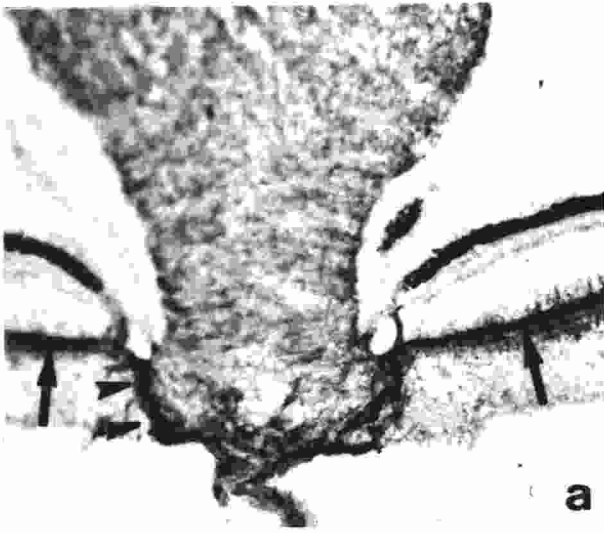


Figura 8:

Secciones verticales de retina correspondientes a los embriones del grupo control sacrificados a los 13 (**a y b**) y 20 días de incubación (**c-g**). BR: base de células fotorreceptoras. CNE: capa nuclear externa. CPE: capa plexiforme externa. CPI: capa plexiforme interna. CG: capa de células ganglionares. CFN: capa de fibras del nervio óptico. s flechas: sinapsis en barra a nivel de la CPI. Observe la presencia de imágenes de mielina (m) y de axones mielinizados (a), en vecindad con los pies de las células de Müller (M), a nivel de la CFN.

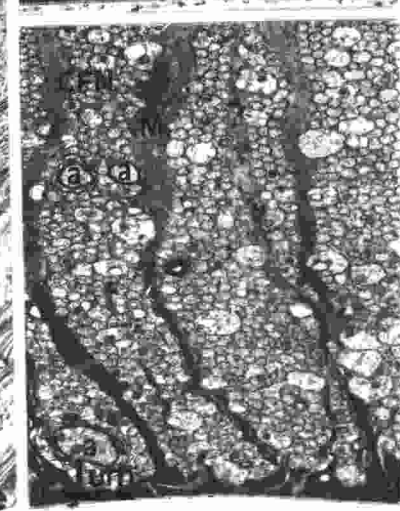
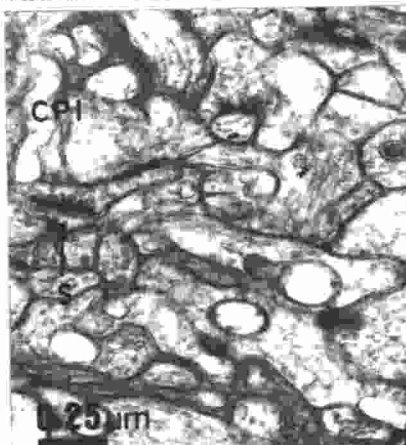
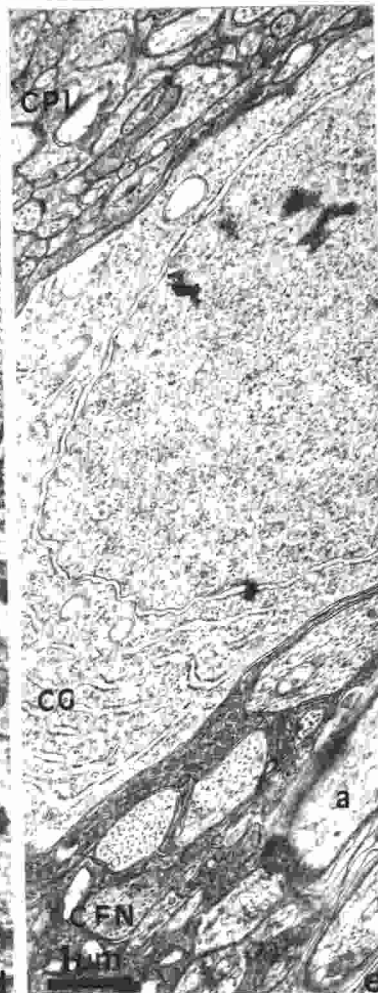
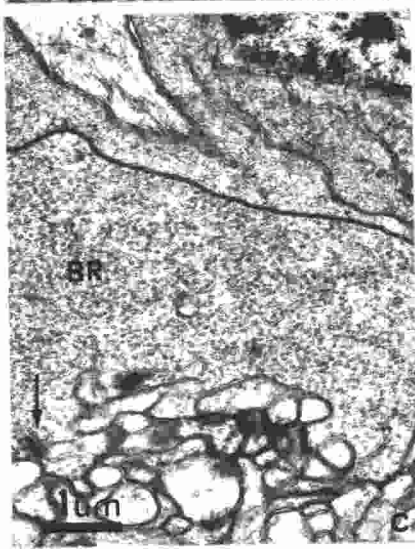
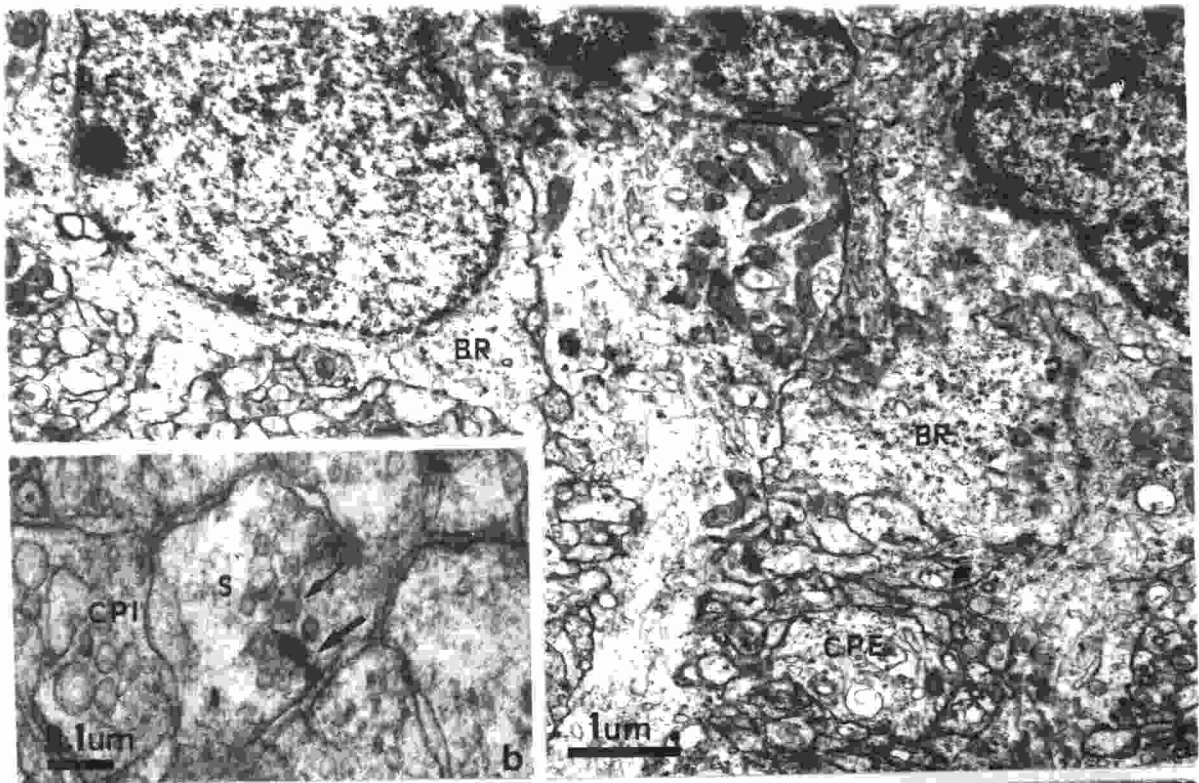


Figura 9:

Secciones verticales de retina pertenecientes a embriones experimentales que fueron inyectados con GLU a los 2 días de incubación y sacrificados a los 13 días de desarrollo (E-13). BR: base de células fotorreceptoras. cc: cono de crecimiento. CPE: capa plexiforme externa. M: célula de Müller. Observese la degeneración hidrópica (asteriscos) que experimentan el citoplasma de las bases de los fotorreceptores, **(a y d)**, células horizontales **(b y c)**, bipolares **(e)** y células de Müller **(f)**.

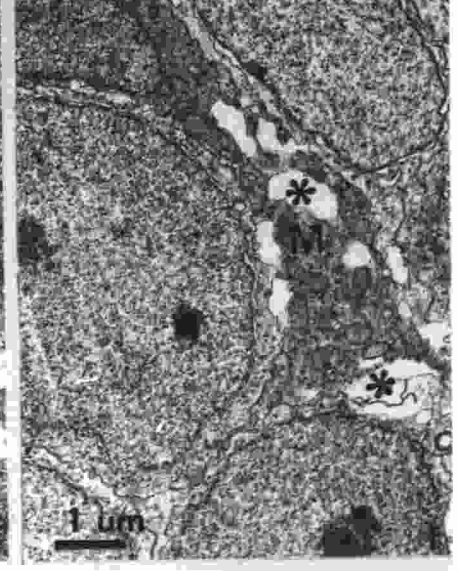
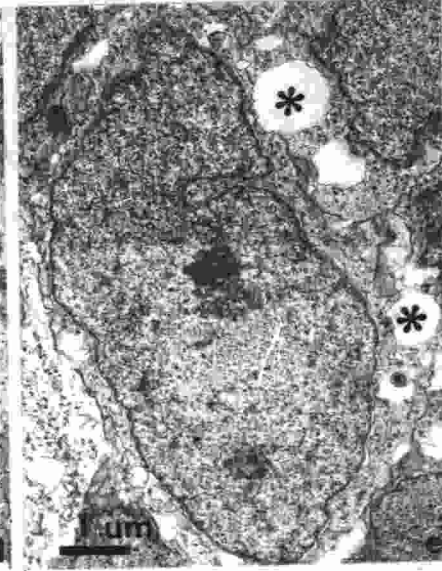
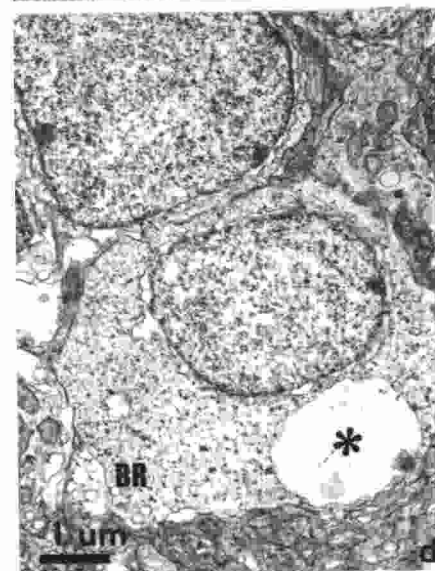
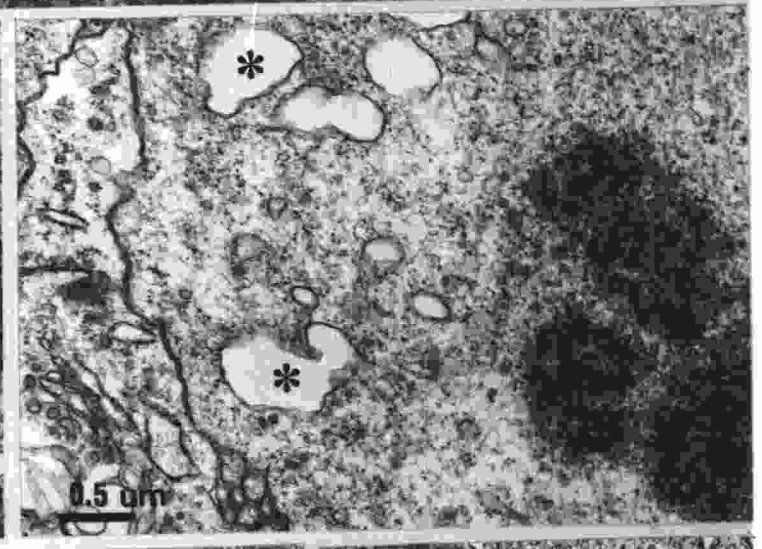
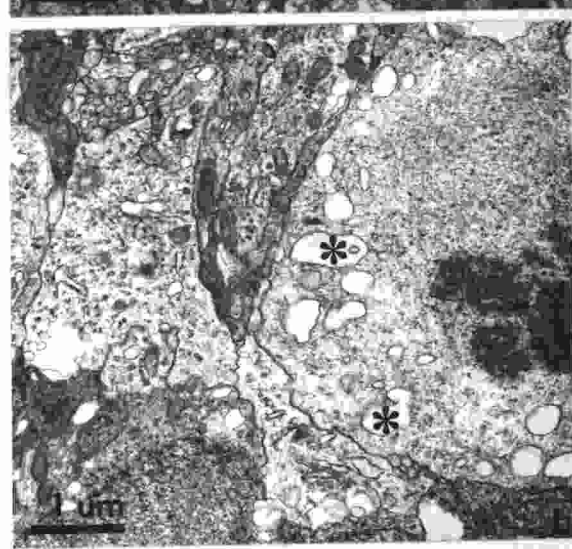
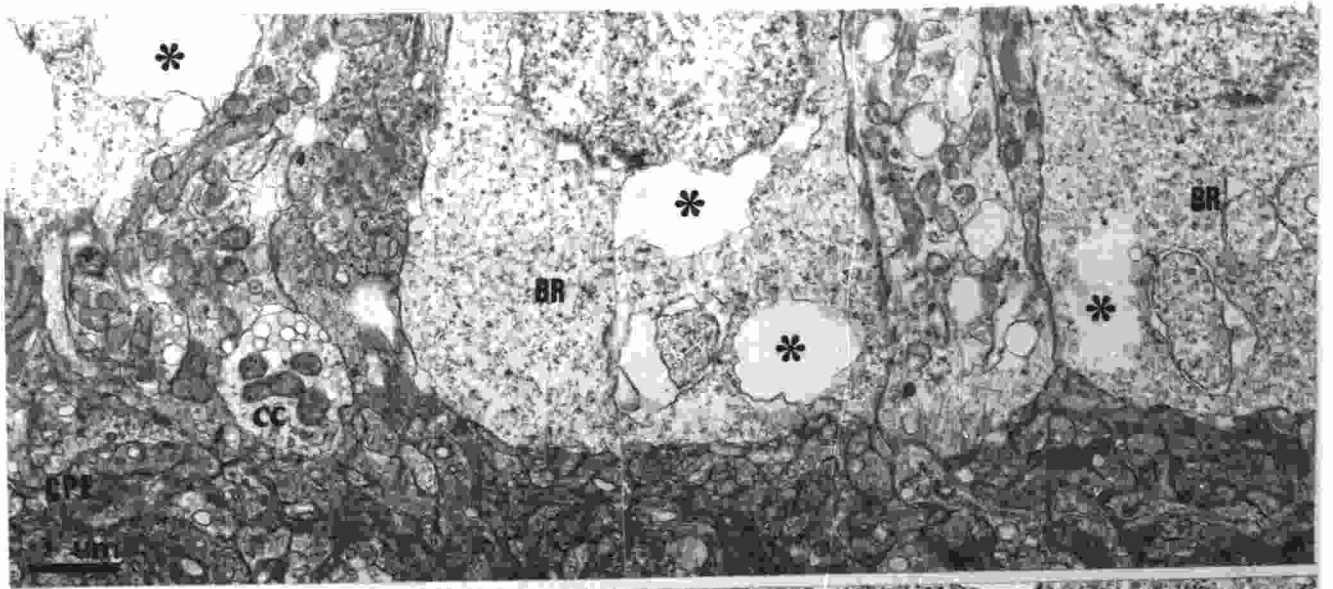


Figura 10:

Secciones verticales de retina correspondientes a embriones del grupo experimental GLU inyectados a los 2 días de incubación (E-2) y sacrificados a los 13 días de desarrollo (E-13). **a:** célula amacrina en fase picnótica (A). Los asteriscos indican la degeneración hidrópica del citoplasma de una célula de Müller. Las flechas finas y gruesas señalan un escombros celular. **b-f:** secuencia de formación de una picnosis.

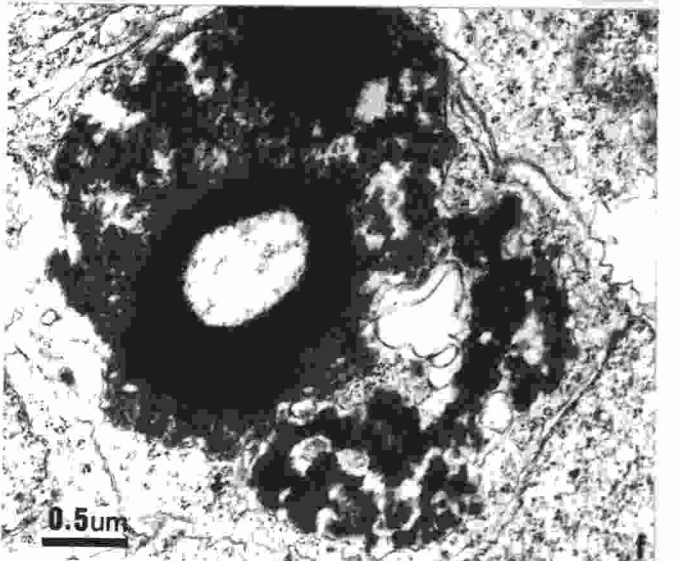
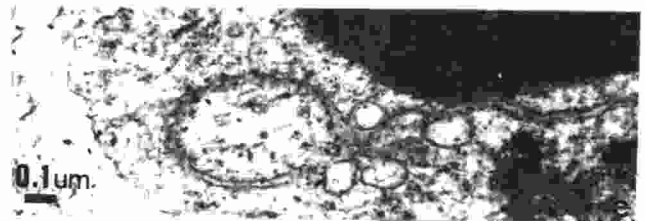
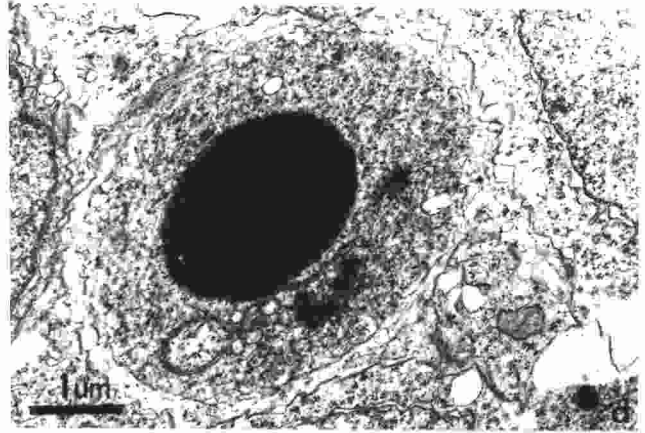
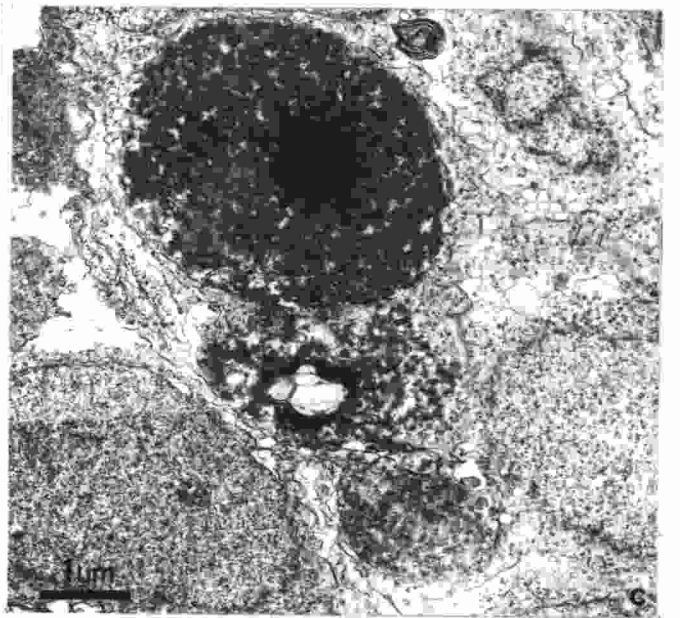
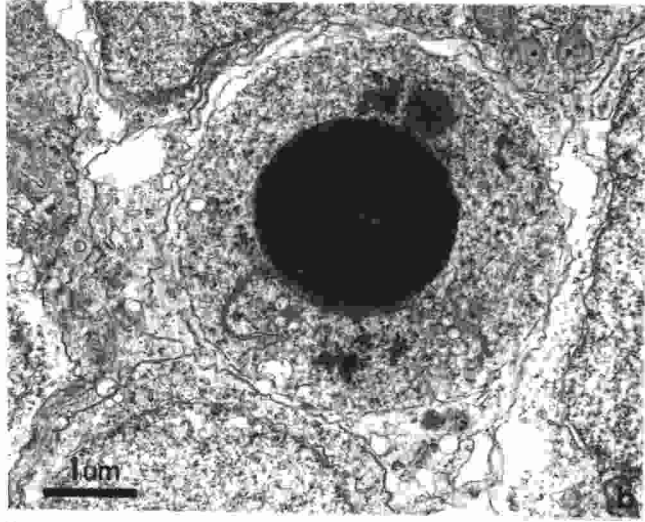
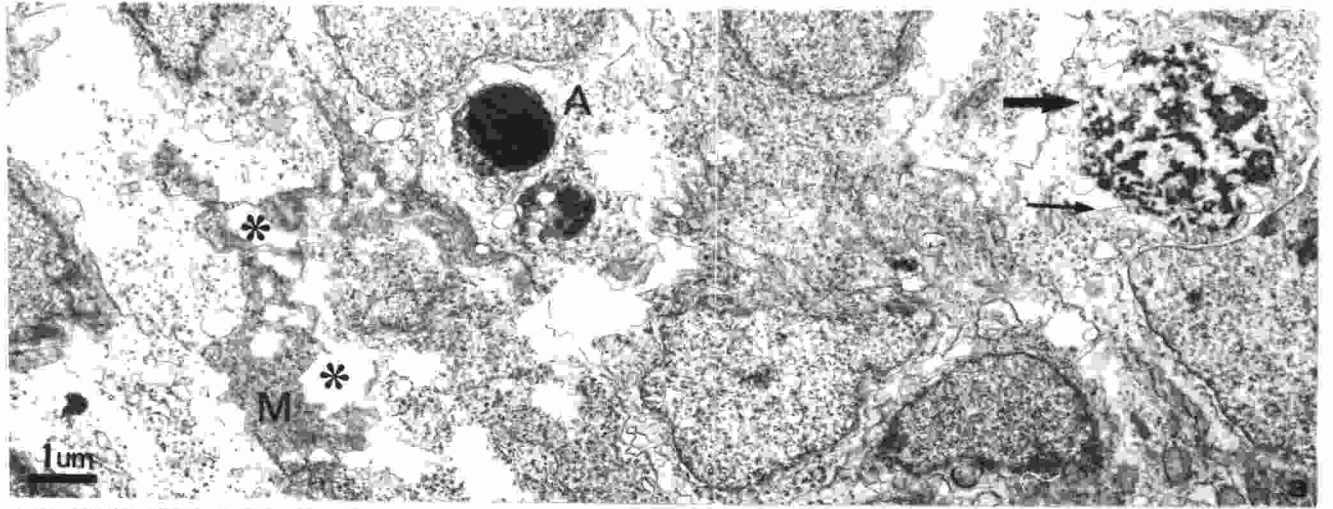


Figura 11:

Secciones verticales de retina correspondientes a embriones experimentales inyectados con GLU a los 2 días de incubación (E-2) y sacrificados a los 13 días de desarrollo (E-13). **a:** degeneración vacuolar de las bases de los fotorreceptores. **b:** la flecha hueca señala un cono de crecimiento axónico en degeneración. **c:** célula intraplexiforme (i). **d:** degeneración de una célula de Müller (M). **e:** célula ganglionar en fase picnótica (G).

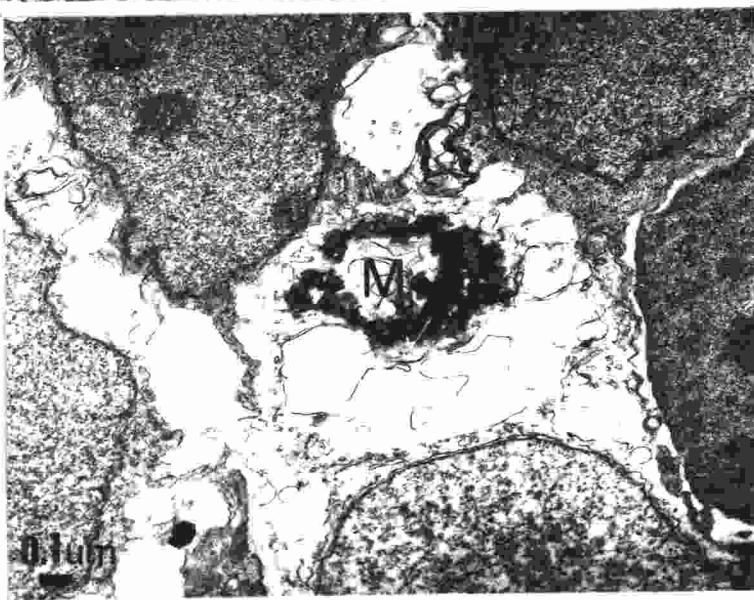
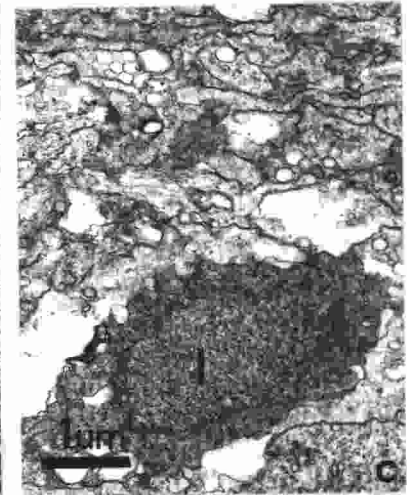
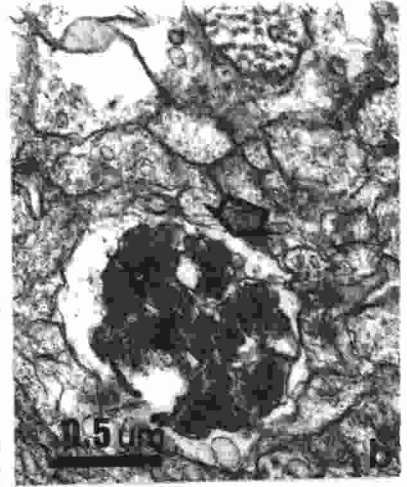
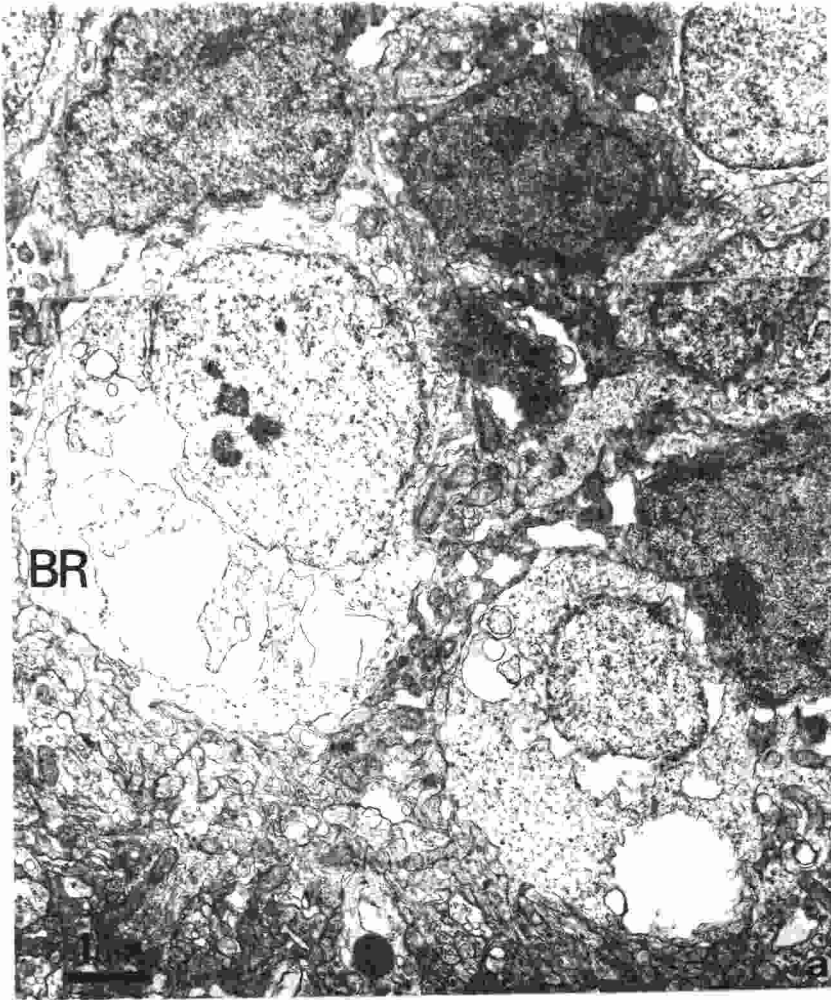


Figura 12:

Secciones verticales de retina correspondientes a embriones experimentales del grupo MEL + GLU inyectados a los 2 días de incubación (E-2) y sacrificados a los 13 días del desarrollo (E-13). **a:** Obsérvese la presencia de escasas prolongaciones de aspecto degenerado (flechas) y de espacios extracelulares agrandados (asteriscos) en el espesor de la capa nuclear interna (CNI). **b:** las cabezas de flecha señalan el rico empaquetamiento axonal de la capa de fibras del nervio óptico. **c:** detalle de una prolongación de aspecto degenerado.

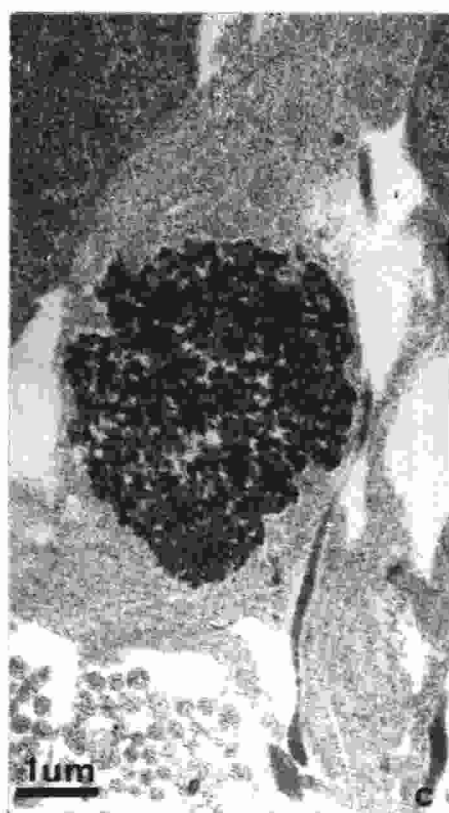
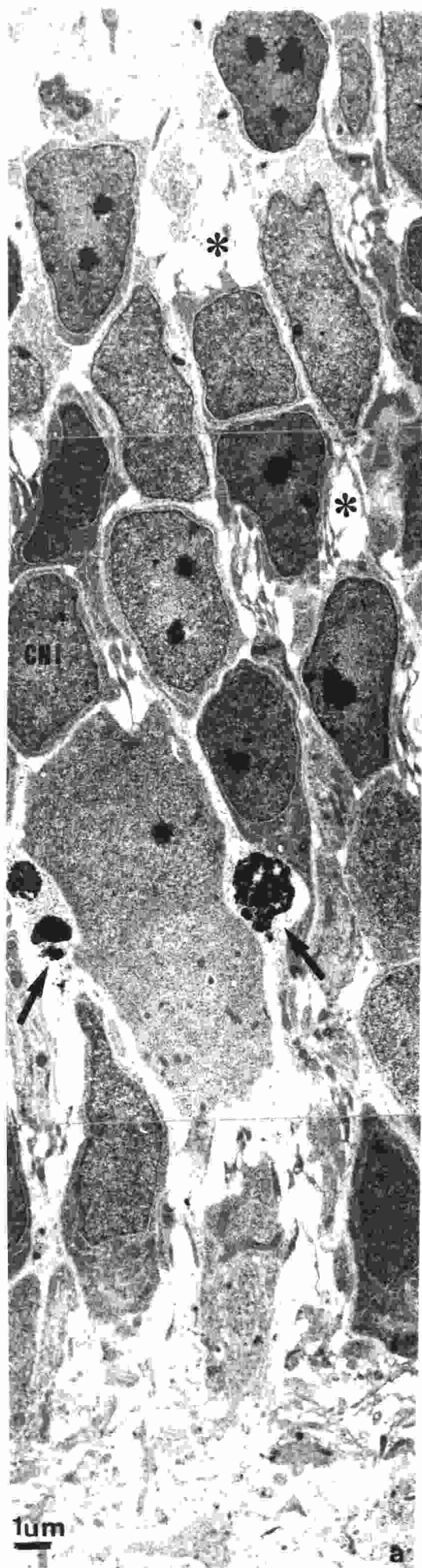


Figura 13:

Secciones verticales de retina correspondientes a embriones del grupo experimental GLU inyectados a los 6 días de incubación (E-6) y sacrificados a los 20 días de desarrollo (E-20) **a:** CPI: capa plexiforme interna. CG: capa de células ganglionares. CFN: capa de fibras del nervio óptico. M: pie de célula de Müller. MLI: membrana limitante interna. P: célula ganglionar en fase picnótica. **a:** destacan los abundantes espacios extracelulares (flecha gruesa) en el espesor de la CPI y en el estrato de la CG (asteriscos), algunos de los cuales están ocupados por conos de crecimiento (flechas finas), y el hallazgo de conos de crecimiento axónico (cc) en la CFN. **b:** detalle la CFN de la imagen anterior.

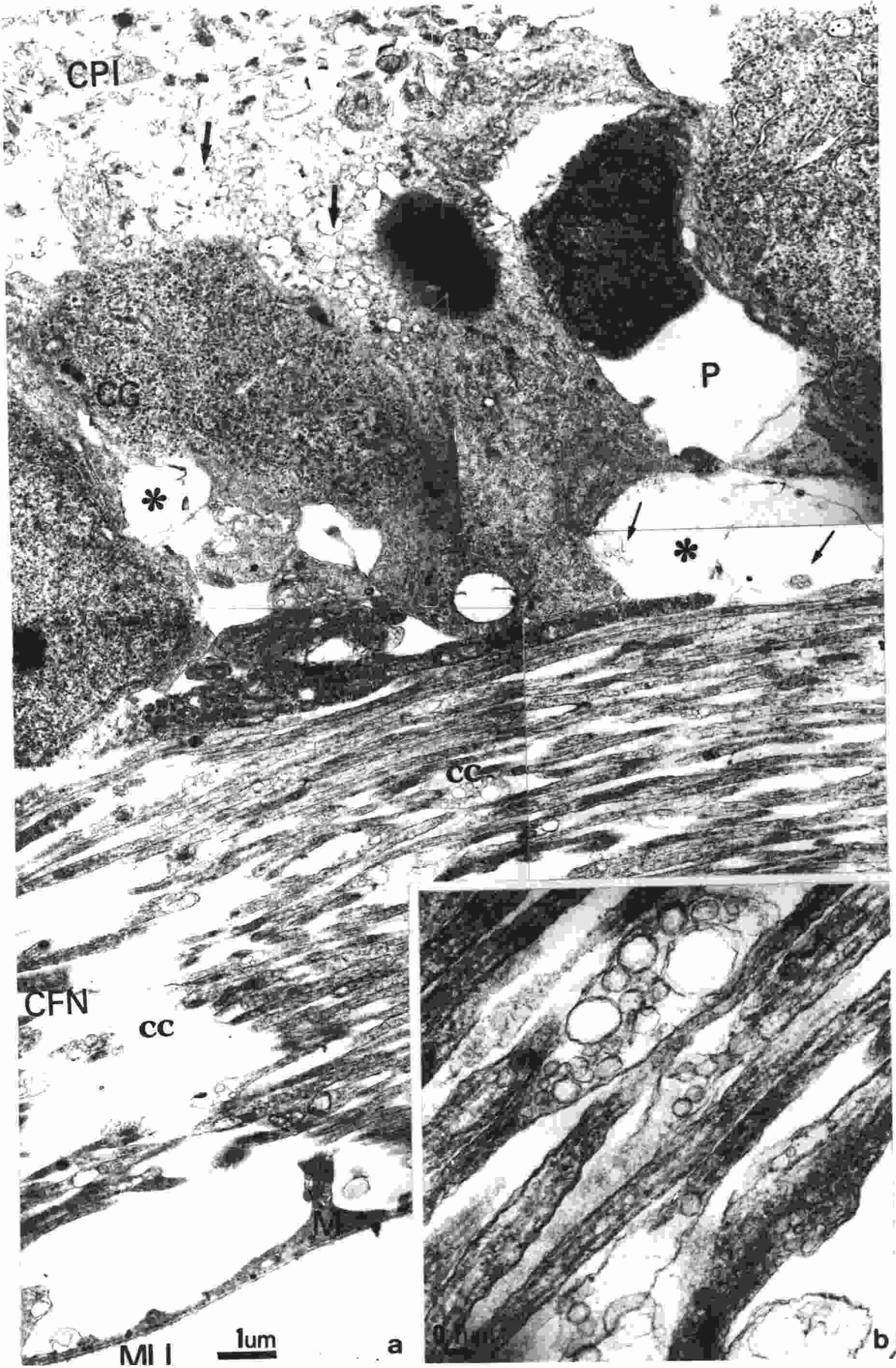


Figura 14:

Secciones verticales de retina correspondientes a embriones experimentales del grupo MEL+GLU inyectados a los 6 días de incubación (E-6) y sacrificados a los 20 días de desarrollo (E-20). **a:** MLE: membrana limitante externa. CNE: capa nuclear externa. CPE: capa plexiforme externa. **b:** BR: base de fotorreceptor. Las flechas señalan sinapsis en barra con las prolongaciones de células bipolares y horizontales **c:** las flechas señalan formaciones sinápticas maduras a nivel de la CPI.

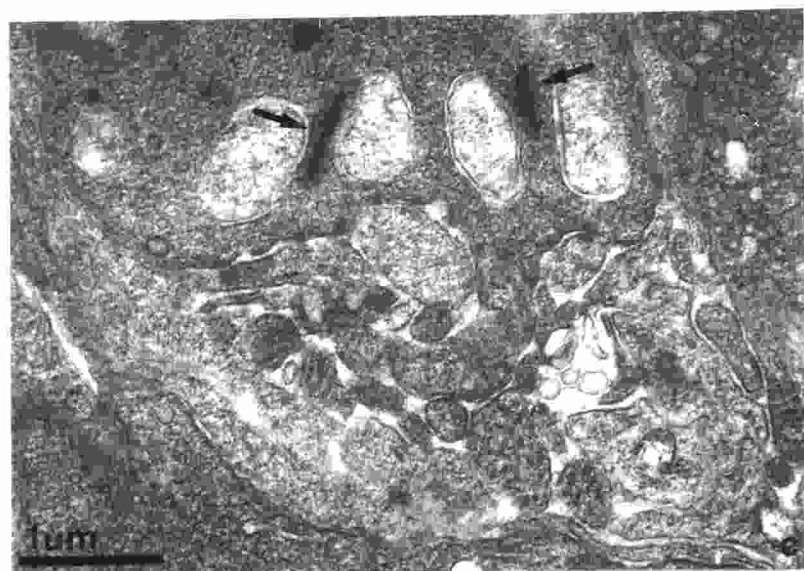
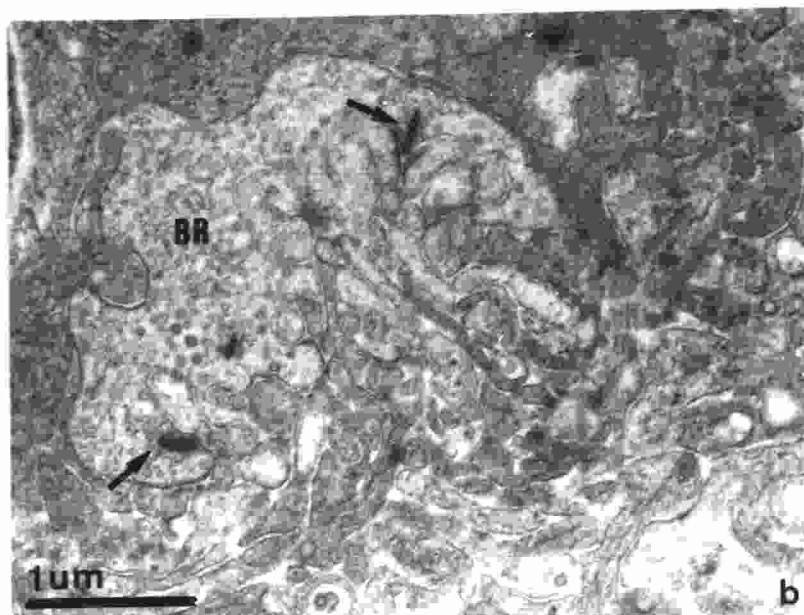
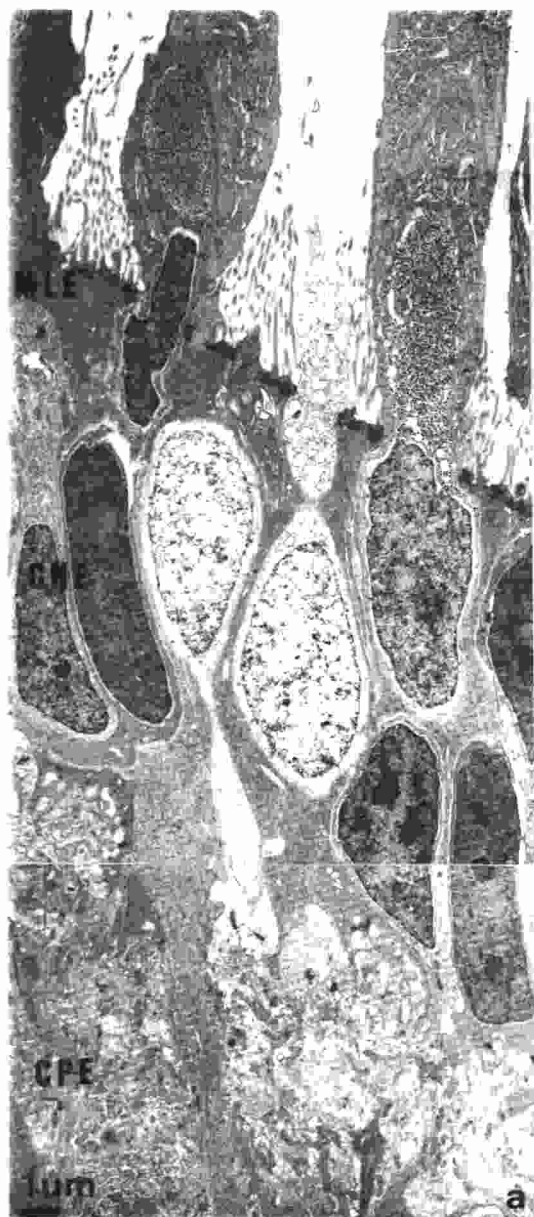
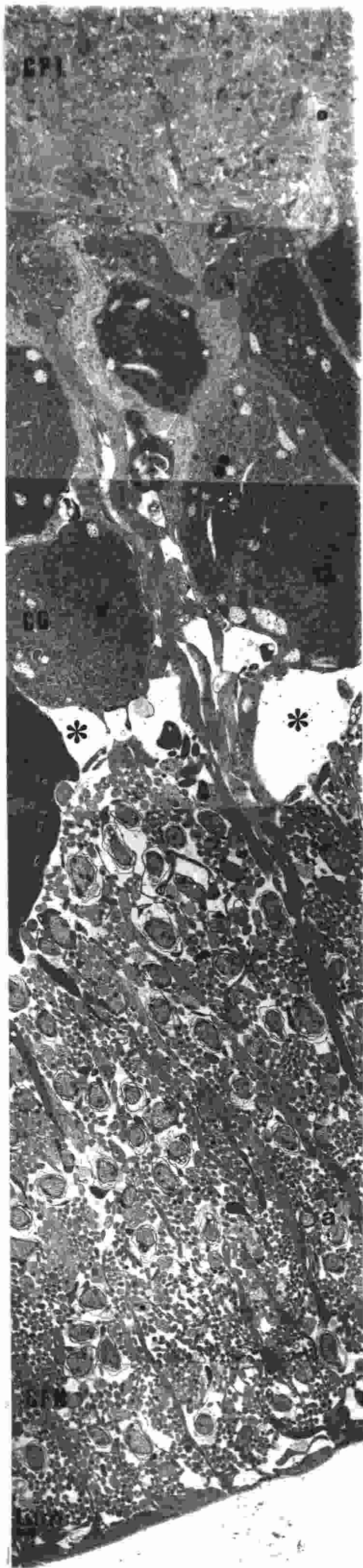


Figura 15:

Sección vertical de retina correspondiente a embrión del grupo experimental MEL+GLU inyectado a los 6 días de incubación (E-6) y sacrificado a los 20 días de desarrollo (E-20). CPI: capa plexiforme interna. CG: capa de células ganglionares. CFN: capa de fibras del nervio óptico. Destaca la ausencia de muerte celular a nivel de la CG y la incipiente degeneración vacuolar del citoplasma (asteriscos). Obsérvese la presencia de axones mielinizados (a) en la CFN.



7. DISCUSSION

7.1. NUESTRO MODELO EXPERIMENTAL

Durante los últimos veinte años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento del papel que el GLU ejerce sobre el SNC, tanto como neurotransmisor y/o neurotóxico (Bittigau e Ikonomidou, 1977). Así, es de sobra conocido que altas concentraciones de GLU, en torno a 1 mM, son capaces de producir daño neuronal in vitro (Krieglstein, 1977), ya que una activación de sus receptores produce muerte celular en cultivos (Choi y cols., 1987; Michaels y Rothman, 1990). Esta muerte neuronal inducida por la activación de los receptores glutamatérgicos en cultivos celulares puede seguir dos vías diferentes: una forma aguda y una retardada (Beal, 1992. 1994). La neurotoxicidad aguda se caracteriza por una dilatación de la célula en presencia de agonistas glutamatérgicos, que trae como consecuencia la lisis osmótica de la membrana (necrosis) siendo los dos iones responsables de la entrada masiva de agua el Na^+ y el Cl^- . La segunda forma de degeneración neuronal es mediada por mecanismos dependientes de Ca^{2+} , llegándose a la muerte neuronal por varios mecanismos que incluyen activación de las proteinquinasas, fosfolipasas A_2 , óxido nítrico sintetasa, proteasas, generación de radicales libres, daño mitocondrial e inhibición de la síntesis proteica (Meldrum y Garthwainte, 1990; Lazarewicz y cols., 1990; Boisvert, 1992; Sapolsky, 1992; Coyle y Puttfarcken, 1993; Michell y cols., 1994; Steller, 1995).

In vivo, numerosas aportaciones han demostrado que la liberación al medio extracelular de altas concentraciones de GLU también desencadena

una cadena de neuroexcitotoxicidad que conduce inexorablemente a la muerte celular. Así, múltiples estudios han demostrado como el GLU está involucrado en la degeneración neuronal tras hipoxia (Pulsinelli, 1992) o trauma (Lipton, 1994). De esta manera diversas experiencias en la que se han utilizado modelos globales de isquemia han demostrado como en dichos procesos subyace una base de un masivo incremento de concentraciones extracelulares de GLU y glicina (Benveniste y cols., 1984; Globus y cols., 1988), obteniéndose similares resultados en modelos de isquemia focal (Miyashita y cols., 1994; Uchiyama-Tsuyuki y cols., 1994) y en modelos de traumatismos cerebrales y medulares (Liu y cols., 1991; Palmer y cols., 1993):

Los datos aportados por estos estudios permiten comenzar a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en las enfermedades neurodegenerativas cuya base radica en la neurotoxicidad glutamatérgica, en el sentido de que cualquier compuesto capaz de abortar la cascada excitotóxica que produce la activación de los receptores glutamatérgicos, conllevaría a detener los procesos de muerte neuronal. Entre estos agentes, son los antagonistas de los receptores glutamatérgicos, inhibidores de la óxido nítrico sintetasa y los neutralizadores de radicales libres, los que cobran un mayor relieve en la lucha contra la neurotoxicidad inducida por GLU (Bittigau e Ikonohidou, 1997; Krieglstein, 1997).

Las propiedades antioxidantes de la MEL, aparte de estar sobradamente demostradas (Reiter, 1995), son altamente específicas y

dependientes de su estructura molecular (Tan y cols., 1993). La MEL no sólo es un potente neutralizador de radicales libres, sino que además previene a las células del daño biológico causado por las especies reactivas de oxígeno o estrés oxidativo (Sies, 1991; Gagnoli y cols., 1995; Pozo y cols., 1997).

En este contexto, y sobre estos antecedentes, hemos fundamentado el estudio que hemos llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral, con la que pretendemos dar respuesta a dos interrogantes que, desde el planteamiento inicial del mismo, nos asaltaron y que pueden ser sintetizadas en dos cuestiones principales:

1ª.-¿Es la MEL un agente neuroprotector, capaz de atenuar o prevenir, las lesiones inducidas en la visión sobre el proceso de desarrollo y diferenciación de la retina por la administración de altas concentraciones de GLU?

2ª.-¿Tiene la administración exógena de MEL algún efecto no deseable sobre el desarrollo embrionario de la retina?

Para dar respuesta a estas interrogantes hemos diseñado un modelo experimental en el que pudiéramos por un lado, evaluar y seguir la evolución de las lesiones que sobre el desarrollo y diferenciación de la retina produce la administración de GLU, analizando la morfología del patrón de muerte neuronal; y de otro, la influencia que esta pérdida neuronal tiene

sobre el establecimiento de conexiones sinápticas durante la sinaptogénesis. De esta forma, y aplicando el mismo modelo en embriones que sólo recibieron MEL, o que recibieron MEL previamente a la administración de GLU, podríamos obtener la respuesta deseada a nuestros interrogantes iniciales.

En una síntesis global, podemos afirmar que nuestros resultados demuestran que la MEL previene del efecto neurotóxico que sobre la morfogénesis y diferenciación de la retina conlleva la administración de altas dosis de GLU, fenómeno que se constata ultraestructuralmente no sólo por la ausencia de fenómenos de muerte neuronal en los embriones a los que se “protegió” con MEL (Grupos MG), sino por la presencia de una sinaptogénesis acorde con el estadio del sacrificio y similar a la de los grupos controles (Grupos C). Así mismo, podemos afirmar que no hemos observado efectos que alteren el desarrollo de la retina en aquellos embriones a los que sólo se les administró MEL (Grupos M), siendo su morfología ultraestructural y su sinaptogénesis similar a la presentada por los grupos control sacrificados en idénticos estadios.

Así pues, nuestras observaciones constituyen un estudio pionero en el que se demuestra in vivo y durante el desarrollo, el papel neuroprotector de la MEL y su inocuidad sobre los procesos de diferenciación del SNC, como más detenidamente discutimos y razonamos a continuación.

7.2. EXCITOTOXICIDAD DEL GLUTAMATO DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA.

Un hecho destaca de forma predominante en los resultados que hemos obtenido en los grupos experimentales a los que se les inyectó GLU, independientemente del día de la inyección (E-2 y E-6) o del sacrificio (E-13 y E-20): La presencia de muerte neuronal, más llamativa a nivel de los elementos que conforman el tercio interno de la capa nuclear interna de la retina que se hace más evidente a nivel de la capa de células de amacrinas, donde se observan patrones ultraestructurales compatibles con necrosis y apoptosis (Searle y cols., 1982; Gerschenson y Rotello, 1992).

Tradicionalmente, la apoptosis y la necrosis son dos formas distintas de muerte celular, que tienen diferentes patrones morfológicos y moleculares así como una diferente implicación con el tejido circundante (Leist y Nicotera, 1997). La necrosis es una forma patológica de muerte celular, resultante de un daño celular irreversible, que se caracteriza por una dilatación del citoplasma, con lisis de la célula y liberación de su material citoplásmico al medio, el cual frecuentemente dispara una respuesta inflamatoria. La apoptosis, en cambio, es un proceso morfológicamente y molecularmente distinto al de la necrosis que al estar presente en todas las células del organismo y tener una función complementaria y opuesta a la proliferación celular, se la ha considerado como un proceso fisiológico, en el que bajo el término apoptosis se engloban los fenómenos de muerte neuronal programada (Wyllie y cols., 1980; Savill y cols., 1993; Cohen,

1993).

En nuestro análisis ultraestructural hemos evidenciado patrones de muerte celular caracterizados por una progresiva cario y citolisis, patrón característico de necrosis (Searle y cols., 1982; Walker y cols., 1988) que afectan a grupos celulares a nivel de la capa ganglionar de manera predominante, junto con células aisladas, o en menos cuantía cuyo patrón de muerte neuronal se caracteriza por progresiva condensación y encogimiento del núcleo que conlleva a la denominada por Olney (1986) degeneración celular negra o muerte apoptósica.

En este sentido, y aún asumiendo la dificultad que supone la extensión de conclusiones de estudios in vitro a sistemas in vivo (Columbano, 1995), nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la apoptosis, no sólo es una forma de muerte neuronal asociada al desarrollo, sino que también esta involucrada en las lesiones degenerativas del SNC causadas por un mecanismo de excitotoxicidad.

Así pues pensamos junto a Leist y Nicotera (1997) que tras la exposición a GLU, la apoptosis y la necrosis, son dos formas de muerte celular que pueden coexistir y ser fenómenos secuenciales. Así, si bien el mayor número de neuronas mueren en la fase aguda tras la administración de GLU por una muerte necrótica, otras sufren una muerte retrasada de naturaleza apoptósica, de la cual también es responsable la excitotoxicidad que provoca el GLU y en cuyo mecanismo molecular intervienen de forma predominante el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica, la estimulación de

la óxido nítrico sintetasa y la formación de peroxinitritos (Siesjo y cols., 1989; Wood y Youle, 1994). En este sentido pensamos que es muy acertada la conclusión de los estudios de Pavón y cols. (1998) al aseverar que la muerte celular en el sistema nervioso puede seguir dos secuencias de eventos diferentes: necrosis o apoptosis, y que estas formas ocurren tanto en periodos críticos del desarrollo como de manera secundaria a una lesión, por lo que ambos tipos de muerte, aunque diferentes pueden ser inducidas por un mismo agente en dependencia del tipo de célula.

Nuestro estudio también corrobora la hipótesis de que ciertos tipos de células pueden exhibir diferentes patrones de muerte celular según sean los condicionantes fisiológicos o patológicos a los que está expuesta en su medio (Schweichel y Merke, 1973).

Otro aspecto a considerar en las lesiones que sobre el desarrollo de la retina induce la administración de GLU son, de un lado, el dar una explicación plausible del porqué una de las constantes en nuestras observaciones ha sido la casi inexistencia de ramificaciones dendríticas de las células amacrinas, fenómeno que ya constatábamos a los 13 días de incubación (E-13), pero que aún eran más evidentes en aquellos de más tardía inyección y sacrificio (E-20), en los que no sólo evidenciábamos una nula ramificación de dendritas, sino fenómenos de muerte neuronal en las propias células ganglionares; y de otro, el considerable retraso en la sinaptogénesis que sistemáticamente hemos evidenciado a nivel de la capa plexiforme interna, que como en la consideración anterior todavía cobraban

mayor relieve en los embriones inyectados con GLU a los 6 días de incubación (E-6) y sacrificados perinatalmente (E-20).

A este respecto pensamos que todos los signos de afectación que nuestros resultados recogen de las neuronas amacrinas y ganglionares, como son : desorientación y/o degeneración de troncos dendríticos y muerte celular, se deben a la destrucción masiva que el GLU ejerce sobre sus principales conexiones glutamatérgicas en el circuito retiniano

La relación existente entre el desarrollo dendrítico de las neuronas glutamatérgicas retinianas y la diferenciación de las células amacrinas se basa en que las células amacrinas completan su diferenciación, una vez que las células ganglionares están concluyendo su emigración hacia la capa ganglionar, de forma que su desarrollo es estimulado por los contactos dendríticos que establecen con dichas células ganglionares. Un hecho similar ha sido corroborado en el cerebelo cuando en modelos experimentales, en los que se han destruido las células grano, con irradiación X (Hamori, 1973), antimitóticos (Woodward y cols., 1975) o alteraciones genéticas (Sotelo, 1975), las dendritas de las células de Purkinje no se desarrollan o aparecen mal desarrolladas, siendo el establecimiento de conexiones sinápticas entre las fibras paralelas y las dendritas de las células de Purkinje un punto clave que controla durante el desarrollo la diferenciación de las células de Purkinje.

Es precisamente esta desaferentación sináptica de las células amacrinas tras la masiva muerte de las neuronas ganglionares, lo que nos

justifica el hecho de que sea conforme avanza el desarrollo, cuando podamos detectar fenómenos de muerte neuronal a nivel de las capas internas de la retina, siendo el retraso en la diferenciación de su árbol dendrítico en los embriones sacrificados a los 13 días de desarrollo (E-13) el proceso inicial de una compleja degeneración que se completa en estadios perinatales con la lisis de la propia neurona .

Pensamos que las alteraciones que hemos detectado a nivel de la sinaptogénesis en la capa plexiforme interna, que morfológicamente se caracterizan por presentar contactos sinápticos inmaduros, no son más que la imagen morfológica a la que conlleva la destrucción de los procesos dendríticos y secundariamente axonales como consecuencia directa de la excitotoxicidad que induce el GLU al activar de forma incontrolada los receptores de GLU de las neuronas y terminales glutamatérgicas. Asimismo creemos, que en el mecanismo molecular de este proceso podría tener especial relieve la acumulación a nivel de las terminales presinápticas de óxido nítrico (Aoki y cols., 1993), que de por sí, no sólo desempeña un papel importante en funciones fisiológicas normales relacionadas con la neurotransmisión y plasticidad sináptica, sino que también puede estar involucrado en desórdenes neurodegenerativos en los que una excesiva producción de óxido nítrico, como el que se desencadena en las neuronas tras la activación de la óxido nítrico sintetasa por exposición a altas dosis de GLU (Hall y cols., 1993), conduce a daños neuronales (Yun y cols., 1997).

7.3. EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA MELATONINA.

Uno de los principales atractivos que en sí lleva implícito el desarrollo de nuestro modelo experimental, es poder evaluar in vivo, como se diferencia la retina del embrión de pollo bajo la influencia de un aporte exógeno de MEL.

De nuestras observaciones al microscopio óptico podemos destacar que no sólo es normal la configuración, organización y diferenciación de los diferentes tipos de neuronas y células gliales que conforman la citoarquitectura de la retina, sino que da la impresión cualitativa de que estos procesos se ven favorecidos ante la presencia de MEL.

El principal hallazgo que podemos aportar tras la realización del presente estudio es demostrar que la administración exógena de MEL, administrada intravitelino en embriones de pollo, previene del daño celular causado por la neurotoxicidad del GLU durante el desarrollo de la retina.

Si bien este efecto neuroprotector de la MEL también ha sido constatado in vivo y en mamíferos por otros autores (Antolín y cols., 1996; Giusti y cols., 1996 a y b; Manev y cols., 1996), este es el primer estudio donde dicho efecto se constata en aves y en el desarrollo embrionario de la retina.

Basamos las afirmaciones que acabamos de efectuar en el análisis comparativo que hemos realizado con ayuda de la microscopía óptica y

fundamentalmente de la microscopía electrónica de transmisión, entre los grupos control, inyectados con GLU e inyectados con MEL ½ hora antes a la administración de GLU que fueron sacrificados a los 13 y 20 días de desarrollo (E-13 y E 20, respectivamente), en los que hemos estimado el daño causado a la retina por la administración de GLU analizando fundamentalmente a nivel ultraestructural los signos de muerte neuronal y la sinaptogénesis a nivel de las diferentes capas de la retina en desarrollo.

Uno de los principales datos que hemos podido constatar y que queremos poner de relieve, antes de pasar a evaluar desde el punto de vista morfológico el papel neuroprotector de la MEL en las lesiones inducidas sobre el desarrollo de la retina por la administración de GLU, es precisamente el alto grado de difusión que esta hormona posee (Menéndez-Peláez y cols., 1993; Reiter, 1993) ya que bastó con administrarla intravitelinamente sólo ½ hora antes para conseguir el efecto neuroprotector deseado.

Los datos que hemos obtenido en nuestro estudio al microscopio óptico (Figs.1-7), ponen en clara evidencia la recuperación neuronal y tisular que experimenta el tercio interno de la retina en los embriones que recibieron MEL Y GLU, al ser comparados con los que sólo fueron inyectados con GLU, recuperación que es aún más evidente en aquellos embriones en los que hemos estudiado la expresión de los antígenos que reconocen a los anticuerpos 3CB2 y 3BA8 (Figs. 6 y 7). Nuestros resultados demuestran que el GLU en concentraciones superiores a las

fisiológicas provoca deterioro de algunas de las proteínas que forman parte de las células nerviosas y gliales. La inyección de MEL previa a la de GLU, reduce significativamente los efectos neurotóxicos de este y contribuye de manera decisiva a que la expresión de los antígenos 3CB2 y 3BA8 durante el desarrollo, se normalicen.

Por lo tanto se puede afirmar que la regeneración que experimenta los embriones tratados con MEL se puede fundamentar morfológicamente aduciendo que la recuperación se debe al efecto directo que ejerce la MEL sobre los fenómenos de muerte celular, ya que el reducir drásticamente el número de elementos picnóticos a nivel de la capa de células ganglionares hace que estos elementos puedan ser recontados como elementos celulares conformantes de dicha capa, a la vez que nos permite evidenciar que la administración de MEL no interfiere en el proceso de emigración de las células ya que a los 20 días de desarrollo (E-20), el grosor de las capas del tercio interno de la retina fue similar a la presentada por los grupos control sacrificados en el mismo estadio.

El análisis ultraestructural que hemos efectuado durante el desarrollo retiniano de los embriones inyectados con MEL $\frac{1}{2}$ hora antes a la administración de GLU, a los 2 y 6 días de incubación (E-2; E-6) para ser sacrificados a los 13 y 20 días de desarrollo, respectivamente (E-13; E-20), confirman la neuroprotección que la MEL ejerce sobre el daño neuronal causado por la excitotoxicidad glutamatérgica que no sólo se manifiesta por la prácticamente inexistencia de signos indicativos de muerte neuronal sino

por presentar una sinaptogénesis similar a la presentada por los embriones control sacrificados en idénticos estadios

Así, pensamos que si bien la MEL protege de la excitotoxicidad glutamatérgica a través de su acción antioxidante (Reiter, 1995) al ser un potente neutralizador de los radicales hidroxilos, estrés oxidativo, peroxidación lipídica y daño mitocondrial (Gagnoli y cols., 1995; Scaciano, 1995; Daniels y cols., 1995; Sewerynek y cols., 1995) que se producen por la activación incontrolada de los receptores glutamatérgicos ante un considerable aumento de concentración de GLU en el medio extracelular tanto a los 13 como a los 20 días de desarrollo, el hecho de que la recuperación en los embriones previamente tratados con MEL sea más manifiesta a los 20 días de desarrollo (E-20) que a los 13 días (E-13), tal y como demuestran nuestros resultados de microscopía óptica y electrónica de transmisión, se debe a que en los estadios perinatales (E-20), no sólo se está neutralizando la cascada neurotóxica inducida por el GLU gracias a la acción antioxidante de la MEL, sino a que en estos estadios la presencia de actividad de glutamina sintetasa determina que decrezcan los niveles de GLU a nivel extracelular (por la captación del mismo que hacen los astrocitos y su conversión en glutamina) lo que reduce de alguna forma, la activación de los receptores glutamatérgicos y la inducción del daño neuronal subsiguiente. Esta enzima que en el SNC se localiza a nivel de los astrocitos (Noremborg y Martínez-Hernández, 1979; D'Amelio y cols., 1990) cataliza la síntesis de glutamina a partir de GLU y amonio en presencia de

ATP. Diferentes estudios han demostrado que durante el desarrollo del embrión de pollo la expresión de glutamina sintetasa es muy baja durante los estadios iniciales del mismo, incrementándose rápidamente su expresión entre los 15 y 21 días de desarrollo (E-15; E-21; Moscona, 1972; Moscona y Linser, 1983; Prada y cols., 1998), si bien su expresión puede ser inducida prematuramente alrededor de los 8 días de desarrollo por la presencia de cortisol; estudios que han sido realizados tanto in vivo (Linser y Moscona, 1979), como in vitro (Morris y Moscona, 1990).

Si bien es cierto que aún debe avanzarse más en la comprensión de los factores desencadenantes de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas, creemos que los datos aportados en el presente estudio experimental, permiten el comenzar a asentar las bases sobre las cuales se comiencen a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en las cuales la MEL pueda ser considerada como un agente farmacológico para el tratamiento de dichas patologías neurodegenerativas.

8. CONCLUSIONES

1.- La administración intravitelina de glutamato sobre la retina en diferenciación provoca cambios degenerativos en las células neuronales y gliales, principalmente a nivel del tercio interno de la retina.

2.- Estas alteraciones se ven atenuadas en los embriones tratados con melatonina previamente a la administración de glutamato, y no se observan en aquellos embriones a los que solo se les administró melatonina. De este modo podemos establecer que la administración exógena de melatonina, previene del daño celular causado por la neurotoxicidad del glutamato durante el desarrollo retiniano, al ejercer un efecto neuroprotector sobre las lesiones degenerativas.

3.- El tratamiento de la retina en desarrollo con un análogo del glutamato, tal cual es el D-L-Alfa-aminoácido, produce una desestructuración selectiva de las células de Müller que se manifiesta por la existencia de picnosis a nivel del tercio interno de la capa nuclear interna, así como por una degeneración masiva de las células ganglionares.

4.- En los embriones tratados con glutamato y procesados con técnicas de tinción de plata, se observa un retraso considerable en los mecanismos de diferenciación y desarrollo

neuronal, siendo las células amacrinas y ganglionares las que presentan una mayor alteración. Los signos de afectación sobre estas dos tipologías celulares, podrían deberse a la desestructuración masiva que ejerce el glutamato sobre las principales conexiones glutamatérgicas en el circuito retiniano.

5.- Los rasgos de degeneración citológica y retraso en la maduración neuronal, provocados por la neurotoxicidad que ejerce el glutamato sobre la retina de embriones de pollo, también se ponen de manifiesto a nivel ultraestructural. De este modo, a nivel de las capas mas externas, destacamos la vacualización que sufren los pies de los fotorreceptores y la ausencia de estructuras sinápticas, indicativas del comienzo de la sinaptogénesis a nivel de la capa plexiforme externa. Dichos efectos se vieron atenuados en los embriones a los que previamente se les administró melatonina.

6.- Asimismo, los efectos neurotóxicos que el glutamato provoca sobre las capas internas de la retina, se ponen de manifiesto a nivel ultraestructural por la necrosis que sufren las células amacrinas y ganglionares, así como por la pérdida del empaquetamiento axonal de la capa de fibras del nervio optico. Pensamos que esta ausencia de axones mielinizados se debe no sólo a la masiva muerte neuronal de células

ganglionares, sino a la afectación de las propias células de Müller que de esta forma dejarían de mielinizar dichos axones. Estos efectos, también se vieron atenuados en aquellos embriones a los que previamente se les administró melatonina.

7.- El anticuerpo monoclonal 3CB2, que en condiciones de normalidad se expresa en células gliales, deja de expresarse en las células de Müller y células peripapilares de la retina en aquellos embriones que tratamos con glutamato, recuperándose el marcaje del mismo en los embriones a los que previamente administramos melatonina.

8.- De la misma manera, el marcaje de las células amacrinas y ganglionares, que podemos observar en la normalidad con el anticuerpo 3BA8, deja de expresarse en los embriones a los que administramos glutamato, volviendo a mostrar una expresión similar a la de los embriones control, cuando previamente a la inyección de glutamato, administramos melatonina.

9.- Nuestros resultados, al administrar glutamato durante la etapa inicial de la diferenciación retiniana, corroboran la hipótesis de que la apoptosis no es sólo una forma de muerte

neuronal asociada al desarrollo, sino que también está involucrada en las lesiones degenerativas del SNC causadas por un mecanismo de excitotoxicidad.

9. BIBLIOGRAFIA

Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Macías, M., Muñoz Horyos, A., Carballo, A. M., Arauza, M., Montes, R. y Vives, F. (1995): Cell protective role of melatonin in the brain. *J. Pineal Res.*, 19: 57-63.

Akazawa, C.; Ohishi, H.; Nakajima, Y.; Okamoto, N.; Shigemoto, R.; Nakanishi, S. And Mizuno, N. (1994). Expression of mRNAs of L-AP4-sensitive metabotropic glutamate receptors (mGluR4, mGluR6, mGluR7) in the rat retina. *Neurosci. Lett.* 171:52-54.

Antolín, I., Rodríguez, C., Sáinz, R. S., Mayo, J. C., Uría, H., Kotler, M. L., Rodríguez-Colunga, M. J., Tolvía, D. y Menéndez-Peláez, A. (1996): Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *The FASEB Journal*, 10: 882-890.

Aoki, C., Fenstermaker, S., Lubin, M. y Go, C. G. (1993): Nitric oxide synthase in the visual cortex of mononuclear monkeys as revealed by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Brain Res.*, 620: 97-113.

Ashwell, K. (1989). Development of microglía in the albino rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 287:286-301.

Barnstable, C. J. (1993): Glutamate and Gaba in retinal circuitry *Curr. Opin. Neurobiol.*, 3: 520-525.

Beal, M. F. (1992): Mechanisms of excitotoxicity in neurological diseases. *FASEB J.* 6: 3338-3344.

Beal, M. F. (1994): Molecular mechanisms of excitotoxicity. In: Recent advances in the treatment of neurodegenerative disorders and cognitive dysfunction. Eds: Racagni, G., Brunello, N. y Langer, S. Z. *Int. Acad. Biomed. Drug Res. Basel.* pp: 102-111.

Benveniste, H. J., Drejer, A., Schousboe, A. y Diemer, N. H. (1984): Elevation of extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.*, 43: 1369-1374.

Berliner, M.L. (1931). Citologic studies on the retina: I. Normal coexistence of oligodendroglía and myelinated nerve fibers. *Arch. Ophthalmol.* 6:740-751.

Binkley, S., Hryshchyn, M. Y Reilly, K. (1979): N-acetyltransferase activity responds to environmental lighting in the eye as well as in the pineal gland. *Nature*, 281: 479-481.

Bittigau, P. y Ikonomidou, C. (1997): Glutamate in Neurologic diseases. *Journal of Child Neurology*, 12 (8): 471-485.

Blanks, J.C., Reif-Lehrer, L. y Casper, D. (1981): Effects of monosodium glutamate on the isolated retina of the chick embryo as a function of age: a morphological study. *Exp. Eye res.*, 32: 105-124.

Blask, D. E., Wilson, S. T. y Lemus-Wilson, A. M. (1994): The oncostatic and oncomodulatory role of the pineal gland and melatonin. *Adv. Pineal Res.*, 7: 235-242.

Boisvert, D. P. (1992): Interrelation of excitotoxic and free radical mechanisms. In: Pharmacology of cerebral ischemia. Eds: Krieglestein, J. y Oberpichler-Schwenk, H. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. pp: 311-320.

Boya, J.; Calvo, J.; Carbonell, A.L. y García- Mauriño, E. (1986). Nature of macrophages in rat brain. *Acta anat.* 127:142-145.

Boya, J.; Calvo, J.; Carbonell, A.L. y Borregón, A. (1987). Ultrastructural study on the origin of rat microglía cells. *Acta anat.* 130:329-335.

Boya, J.; Carbonell, A.L.; Calvo, J. y Borregón, A. (1991). Microglial cells in the central nervous system of the rabbit and rat : cytochemical identification using different lectins. *Acta anat.* 140:250-253.

Bradford, H. F. (1988): Los sistemas de neurotransmisores aminoácidos. En fundamentos de neuroquímica. Ed: Labor S. A. Barcelona. pp: 201-216.

Brandstätter, J.H., Koulen, P., Kuhn, R., van der Putten, H. And Wässle, H. (1996). Compartmental localization of a metabotropic glutamate receptor (mGluR7): Two different active sites at a retinal synapse. *J. Neurosci.* 16:4749-4756.

Cagnoli, C.M., Atabay, C., Kharlamov, A. y Manev, H. (1995): Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J. Pineal Res.* 18: 222-226.

Cahill, G. M., Grace, M. S. y Besharse, J. C. (1991): Rhythmic regulation of retinal melatonin: metabolic pathways, neurochemical mechanisms, and the ocular circadian clock. *Cellular and molecular Neurobiology*, 11 (5): 529-559

Cahill, G. M. y Besharse, J. C. (1993): Circadian clock functions localized in *Xenopus* retinal photoreceptors. *Neuron*, 10: 573-577.

Cardinali, D. P. y Rosner, J. M. (1971): Metabolism of serotonin by the rat retina in vitro. *J. Neurochem.* 18: 1769-1770.

Cassone, V. M. (1991): Melatonin and suprachiasmatic nucleus function. In:

Suprachiasmatic Nucleus. Eds: Klein, D. C., Moore, R. Y. y Reppert, S. M. Oxford University Press, pp: 309-323.

Catania, M. V., Landwehrmeyer, G. B. y Testa, C. M. (1994): Metabotropic glutamate receptors are differentially regulated during development. *Neuroscience*. 61: 481-495.

Chan, T. Y. y Tang, P. L. (1996): Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indoleamines in vitro. *J. Pineal Res.*, 20: 187-191.

Choi, D.W. (1992). Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.*,23:1261-1276.

Choi, D. W. (1997): The excitotoxic concept. *Primer on Cerebrovascular Diseases*, 51: 187-190.

Choi, D. W., Maulucci-Gedde, M. y Kriegstein, A. R. (1987): Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.*, 7: 357-368.

Cohen, A.I. (1967): An electron microscopic study of the modification by monosodium glutamate of the retinas of normal and rodless mice. *Am.J.Anat.*, 120: 319-356.

Cohen, J. J. (1993): Overview: Mechanisms of apoptosis. *Immunol. Today*,

14: 126-130.

Columbano, A. (1995): Cell death: Current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J. Cell Biochem.*, 58: 181-190.

Cotman, C. W., Monaghan, D. T. y Storm-Mathisen, J. (1987): Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends in Neurosciences.*, 10: 273-280.

Coyle, J. T. y Puttfarcken, P. (1993): Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*, 262: 689-695.

D'Amelio, F., Eng, L. F. y Gibbs, M. A. (1990): Glutamine synthetase immunoreactivity is present in oligodendroglia of various regions of the central nervous system. *Glia*, 3: 335-341.

Daniels, W.M.U., Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Pablos, M.I. y Ortiz, G.G. (1995): Melatonin counteracts lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride but does not restore glucose-6-phosphatase activity. *J. Pineal Res.* 19: 1-6.

Distler, C.; Weigel, H. y Hoffmann, K.P. (1993). Glía cells of the monkey

retina. I: Astrocytes. *J. Comp. Neurol.* 333:134-147.

Dunlap, K., Lebke, J. I. y Turner, T. J. (1995): Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurones. *Trends in Neurosciences.*, 18: 89-98.

Ehinger, B., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J. y Dowling, J. E. (1988): Bipolar cells in the turtle retina are strongly immunoreactive for glutamate. *Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 8321-8325.

Ehinger, B.; Zucker, C.L.; Bruun, A. y Adolph, A. (1994). In vivo staining of oligodendroglía in the rabbit retina. *Glía* 10:40-48.

Ehrlich, D. (1981). Regional specialization of the chick retina as revealed by the size and density of neurons in the ganglion cell layer. *J. Comp. Neurol.* 195:643-657.

Espinar, A., Osuna, C., Feliu, C. y Guerrero, J. M. (1994): High activity of retinal N-acetyltransferase in the early development of the chick embryo: independence of lighting conditions. *Neuroscience Letters*, 179: 103-106.

Gallo, V., Upso, L. M. y Hayes, W. P. (1992): Molecular cloning and developmental analysis of a new glutamate receptor isoform in cerebellum. *J. Neurosci.* 12: 1010-1023.

Gern, W. A., y Ralph, C. L. (1979): Melatonin synthesis by the retina. *Science*, 204: 183-184.

Gerschenson, L. E. y Rotello, R. J. (1992): Apoptosis: A different type of cell death. *FASEB J.*, 6: 2450-2455.

Giusti, P., Lipartiti, M., Franceschini, D., Schiavo, N., Floreani, M. y Manev, H. (1996, a): Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. *FASEB J.* 10: 891-896.

Giusti, P., Franceschini, D., Petrone, M., Manev, H. y Floreani, M. (1996, b): In vitro and in vivo protection against kainate-induced excitotoxicity by melatonin. *J. Pineal Res.* 20: 226-231.

Globus, My-T, Busto, R. y Dietrich, W. D. (1988): Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and γ -aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.*, 51: 1455-1464.

Golgi, C. (1883): Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso. IV. Sulla fina anatomia delle circonvoluzioni cerebellari. *Rev. Sper. Freniat.*, 9: 1-17.

Hall, Z. W. (1992). An introduction to Molecular Neurobiology. Sinauer

Sunderland MA.

Hall, E. D., Andrus, P. K., Althaus, K. S. y Von Voigtlander, P. F. (1993): Hydroxyl radical production and lipid peroxidation parallels selective post-ischemic vulnerability in gerbil brain. *J. Neurosci. Res.*, 34: 107-112.

Hamberger, A. Cotman, C. W., Sellström, A. y Weiler, C. T. (1978). In: *Dynamic Properties of glial cells*. Eds: Schoffeneils, E., Frank, G., Hertz, L. y Tower, D. B. Pergamon Press, Oxford. pp: 173-182.

Hamburger, V. y Hamilton, H. L. (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88: 48-50.

Hamori, J. (1973): Developmental morphology of dendritic postsynaptic specializations. In: *Recent Developments of Neurobiology in Hungary*. Vol IV. Edit. K. Lissak, pp: 9-32. Budapest.

Hampson, D. R., Theiriault, E., Huang, X.-P., Kristensen, P., Pickering, D. S., Franck, J. E. y Mulvihill, E. R. (1994): Characterization of two alternatively apliced forms of a metabotropic glutamate receptor in the central nervous system of the rat. *Neuroscience*, 60: 325-336.

Hartveit, E., Brandstätter, J.H., Enz, R. And Wässle, H. (1995). Expression

of the mRNA of seven metabotropic glutamate receptors (mGluR1 to 7) in the rat retina. An in situ hybridization study on tissue sections and isolated cells. *Eur. J. Neurosci.* 7:1472-1483.

Headley, P.M. y Grillner, S. (1990): Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends in Pharmacological Sciences* 11:205-211.

Hedlund, L., Lischko, M.M., Rollag, M. D. y Niswender, G. D. (1976): Melatonin cycle in plasma and cerebrospinal fluid of calves. *Science*, 195: 686-687.

Hertz, L. Peng, L. Westergaard, N., Yudkoff, M. y Schousboe, A. (1992): Neuronal-astrocyte interactions in metabolism of transmitter amino acids of the glutamate family. In: *Drugs Research related to Neuroactive Amino Acids*. Eds: Schosboe, A., Diemer, N. H. y Kofod, H. pp: 30-48.

Hidkey, W.F. y Kimura, H. (1998). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239:290-292.

Holländer, H.; Makarow, F.; Dreher, Z.; Van Driel, D.; Chan-Ling, T. y Stone, J. (1991). Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells. *J. Comp. Neurol.* 313:587-603.

Hollmann, M. y Heinemann, S. (1994): Clones glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 31-108.

Holzwarth-Mcbride, M.A., Hurs, E.M. y Knigge K.M. (1976): Monosodium glutamate induced lesions of the arcuate nucleus. *Anat. Rec.* 186: 185-196.

Hudspith, M.J. (1997): Glutamate a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. *Br. J. Anaesth.* 78: 731-747.

Hume, D.A.; Perry, V.H. y Gordon, S. (1983). Immunohistochemical localization of macrophage-specific antigen in the developing mouse retina: Phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J. Cell Biol.* 97: 253-257.

Ianas, O., Olnescu, R. y Badescu, Y. (1991): Melatonin involvement in oxidative stress. *Rom. J. Endocrinol.*, 29: 147-153.

Ishikawa, A., Shiono, T., Ishiguro, S. y Tamai, M. (1996): Postnatal developmental expression of glutamine and related amino acids in the rat retinas. *Curr. Eye Res.*, 2: 662-668.

Jansen, K.L.R., Faull, R.L.M., y Dragunow, M. (1991): Excitatory amino acid

receptors in the human cerebral cortex: a quantitative autoradiographic study comparing the distributions of [^3H] TCP, [^3H] glycine, [^3H] AMPA and [^3H] Kainic acid binding sites. *Neuroscience* 32:587-607.

Jiang, B.; Bezhadian, M.A. y Caldwell, R.B. (1995). Astrocytes modulate retinal vasculogenesis: effects on endothelial cell differentiation. *Glía* 15:1-10.

Jordan, F.L. y Thomas, W.E. (1988). Brain macrophages: question of origin and interrelationship. *Brain Res. Rev.* 13:165-178.

Kallionatis, M. and R.E. Marc (1992). Glutamate, Gaba and glycine immunoreactivity in the macaque monkey retina. *Soc. Neurosci. Abstr.* 18:393.

Kaneko, T. y Mizuno, N. (1992): Mosaic distribution of phosphate-activated glutaminase-like immunoreactivity in the rat striatum. *Neuroscience.*, 49: 329-345.

Karschin, A.; Wässle, H. y Schnitzer, J. (1986). Immunocytochemical studies on astroglia of the cat retina under normal and pathological conditions. *J. Comp. Neurol.* 249:564-576.

Kasiwabuchi, N., Ikeda, K., Araki, K., Hirano, T., Shibuki, K., Takayama, C., Inoue, Y., Kutsuwada, T., Yagi, T., Kang, Y., Aizawa, S., y Mishina, M. (1995): Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long term depression in GluR δ 2 mutant mice. *Cell*, 81: 245-252.

Krieglestein, J. (1997): Excitotoxicity and neuroprotection. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5: 181-187.

Lazarewicz, J. W., Wroblewsky, J. T. y Costa, E. (1990): N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors induce calcium-mediated arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, 55: 1875-1881.

Leist, H. y Nicotera, P. (1997): Cell death: Apoptosis versus necrosis. In: *Primer on Cerebrovascular Diseases*. Ed: Welch, K. M. A., Reis, D. J., Caplan, L. R., Siesjo, B. K. y Weir, B. Academic Press. New York. pp: 101-104.

Leong, S.K. y Ling; E.A. (1992). Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* 6:39-47.

Lerner, A. B., Case, J. B. y Heinzelman, R. V. (1959) : Structure of

melatonin. *J. Am. Chem. Soc.*, 81: 6084-6085.

Linser, P. y Moscona, A.A. (1979): Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: Localization in Müller fibers and dependence on cell interactions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 76: 6476-6480.

Ling, E.A. y Wong; W.C. (1993). The origin and nature of ramified and amoeboid microglía: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18.

Lipton, S. A. (1994): Molecular mechanisms of trauma-induced neuronal degeneration. *Curr. Opin. Neurol.*, 6: 588-596.

Liu, D., Thangnipon, W. y McAdoo, D. J. (1991): Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Res.*, 547: 344-348.

Lucas, D. R. y Newhouse, J. P. (1957): The toxic effect of sodium L-Glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol.*, 58: 193-201.

Lynch, D.R. y Dawson, T.M. (1994): Secondary mechanisms in neural trauma. *Curr. Opin. Neurol.* 7:510-516.

Magalhaes, M.M. y Coimbra, A. (1973). Electron microscope autoradiographic detection of sites of protein synthesis in the rabbit retina

Müller cells. *J. Cell Biol.* 57:77-87.

Marc, R.E. (1986). Neurochemical stratification in the inner plexiform layer of the vertebrate retina. *Vision. Res.* 26:223-238.

Manev, H., Uz, T., Kharlamov, A., Cagnoli, C.M., Franceschini, D. y Giusti, P. (1996): In vivo protection against kainate-induced apoptosis by the pineal hormone melatonin: effect of exogenous melatonin and circadian rhythm. *Restorative Neurology and Neurosciene* 9: 251-256.

Mattson, M. P., Lee, R. E. y Adams, M. E. (1988): Interactions between entorhinal axons and target hippocampal neurons: a role for glutamate in the development of hippocampal circuitry. *Neuron*, 1: 865-876.

McDonald, J. V. y Johnston, M. V. (1990): Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.*, 15: 41-70.

McDonald, J. V. y Schoepp, D. D. (1992): The metabotropic excitatory amino acid receptor agonist 1S, 3R-ACPD selectively potentiates N-methyl-D-aspartate-induced brain injury. *Eur. J. Pharmacol.*, 215: 353-354.

Meister, B., Ceccatelli, S., Hokfelt, T., Anden, N.E., Anden, M. y

Theodorsson, E. (1989): Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the mediobasal hypothalamus: Effects of monosodium glutamate lesions. *Exp. Brain Res.* 76: 343-368.

Meldrum, B. y Garthwainte, J. (1990): Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegeneration disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11: 379-387.

Menéndez-Peláez, A., Poeggeler, B., Reiter, R. J., Barlow-Walden, L., Pablos, M. I. y Tan, D. (1993): Nuclear localitation of melatonin in different mammalian tissues: Immunocytochemichal and radioimmunoassay evidence. *Journal of Cellular Biochemistry*, 53: 373-382.

Michaels, R. L. y Rothman, S. M. (1990): Glutamate neurotoxicity in vitro: Antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J. Neurosci.* 10: 283-292.

Miller, R. J. (1994): G-protein linked glutamate receptor., *Seminars in the Neurosciences.*, 6: 105-115.

Mitchell, I. J., Lawson, S. y Moser, B. (1994): Glutamate-induced apoptosis result in a loss of striatal neurons in the Parkindonian rat. *Neurosci.*, 63: 1-5.

Miyashita, K., Abe, H. y Nakajima, T. (1994): Glutamate release in the gerbil

hippocampus after middle cerebral artery occlusion. *Neuroreport*, 5: 945-948.

Monyer, H., Seeburg, P. H. y Wisden, W. (1991): Glutamate-operated channels: Developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron*, 6: 799-810.

Morris, J. E. y Moscona, A. A. (1990): Induction of glutamine synthetase in embryonic retina : Its dependence on cell interactions. *Science*, 167: 1736-1738.

Moscona, A. A. (1972): Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: A model for the regulation of specific gene expression in embryonic cells. In: *Biochemistry of Cell Differentiation*. Ed: Monroy, A. y Tsanev, R. Academic Press, London. FEBS Symp. Vol. 24. pp: 1-23.

Moscona, A. A. y Linser, P. (1983): Developmental and experimental changes in retinal glia cells: Cell interactions and control of phenotype expression and stability. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 18: 155-188.

Murakami, N., Nakamura, H., Nishi, R. Marumoto, N. y Nasu, T. (1994): Comparison of circadian oscillation of melatonin release in pineal cells house sparrow, pigeon and Japanese quail, using cell perfusion systems.

Brain Res., 651: 209-214.

Nagle, C. A., Cardinali, D. P. y Rosner, J. M. (1972): Light regulation of rat retinal hidroxyndole-O-methyltransferase (HIOMT) activity. *Endocrinology*, 91: 423-426.

Nagle, C. A., Cardinali, D. P. Y Rosner, J. M. (1973): Retinal and pineal hidroxyndole-O-methyltransferase in the rat: changes following cervical sympathectomy, pinealectomy, or blinding. *Endocrinology*, 92: 1560-1564.

Norenberg, M. D. y Martínez-Hernández, A. (1979): Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.*, 161: 303-310.

Ohishi, H., Akazawa, C., Shigemoto, R., Nakanishi, S. y Mizuno, N. (1995): Distributions of the mRNAs for L-2-amino-4-phosphonobutyrate-sensitive metabotropic glutamate receptors, mGluR4 y mGluR7, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 360: 555-570.

Olney, J.W. (1969a): Glutamate- induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 28: 455-474.

Olney, J.W. (1969b): Brain lesions and other disturbances, in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 264: 719-721.

Olney, J. W. (1971): Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus: An electron microscopic study. *J. Neurophatol. Exp. Neurol.*, 30: 75-90.

Olney, J. W. (1982): The toxic effects of glutamate and related compounds in the retina and the brain. *Retina*, 2: 341-359.

Olney, J. W. (1986): Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Adv. Exp. Met. Biol.*, 203: 631-645.

Olney, J. W. y Ho, O. L. (1970): Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature*, 227: 609-610.

Oppenheim, R. (1991): Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14: 453-501.

Palay, J. L. y Chan-Palay, V. (1974): Cerebellar cortex citology and organization. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York.

Palmer, A. M., Marion, D. W. y Botscheller, M. L. (1993): Traumatic brain

injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model.

J. Neurochem., 61: 2015-2024.

Park, J. S., Bateman, M. C. y Goldberg, M. P. (1996): Rapid alterations in dendrite morphology during sublethal hypoxia or glutamate receptor activation. *Neurobiology of Disease*, 3 (3): 215-227.

Pavón, N., Vidal, L., Blanco, L., Alvarez-Fonseca, P., Torres-Montolla, A., Lorigados, L., Alvarez-González, L. y Macías, R. (1998): Factores que desencadenan la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas. *Revista de Neurología*, 26(152): 554-560.

Pellegrini-Giampietro, D. E., Bennett, M. V. L. y Zukin, R. S. (1991): Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: An in situ hybridization study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 4157-4161.

Peng, Y.W., Blackstone, C.D., Huganir, R.L. and Yau, K.W. (1995). Distribution of glutamate receptor subtypes in the vertebrate retina. *Neurosci.* 66:483-497.

Petralia, R. S. (1997): Immunocytochemical localization of ionotropic

glutamate receptors in neural circuits. In: The ionotropic glutamate receptors. Eds: Monaghan, D. T. y Wenthold, R. J. Humana Press, Totowa, New Jersey. pp: 219-263.

Petralia, R. S. Y Wenthold, R. J. (1995): Types of excitatory amino acids receptors and their localization in the nervous system and hypothalamus. In: Their role in neuroendocrine function. Eds: Brann, D. W. y Mahesh, V. B. CRC, Boca Raton, FL. pp: 55-101.

Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R. y Marcheselli, F. (1994): Melatonin: A peroxy radical scavenger more potent than vitamin E. *Life Sci.*, 55: 271-276.

Pin, J.P. y Duvoisin, R. (1995): Review: Neurotransmitter receptors I: The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34: 1-26.

Polyak, S.L. 1941). The retina. Chicago: University of Chicago Press, 345-365.

Pozo, D., Reiter, R.J., Calvo, J.R y Guerrero, J.M. (1997): Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J. Cell. Biochem.*, 65: 430-442

Prada, F.A.; Espinar, A.; Chmielewski, C.E.; Dorado, M.E. y Génis-Gálvez, J.M. (1989). Regional adaptation of Müller cells in the chick retina. A Golgi and electron microscopical study. *Histol. and Histopath.* 4:309-315.

Prada, F. A., Quesada, A., Dorado, M. E., Chmielewski, C. y Prada, C. (1998): Glutamine Synthetase (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the developing chick retina. *Glía*, 22: 221-236.

Pulsinelli, W. (1992): Pathophysiology of acute ischemic stroke. *Lancet*, 339: 533-536.

Ramírez J.M.; Triviño, A.; Ramírez, A.I.; Salazar, J.J. y García Sánchez, J. (1994). Immunohistochemical study of human retinal astroglía. *Vision Res.* 34:1935-1946.

Ramon y Cajal, S. (1892). La retina des vertebres. *La Cellule* 9:119-225.

Ramón y Cajal, S. (1909-1911): Histologie du systeme nerveux de l'Homme et des vertèbrès. 2 vols. *Inst. Ramón y Cajal del C.S.I.C. Madrid (1952-1955)*.

Reif-Lehrer, L., Berghenthal, J., and Hanninen, L.: Effects of monosodium glutamate on chick embryo retina in culture. *Invest. Ophthalmol.*, 14: 114-124.

Reiter, R. J. (1980): The pineal and its hormones in the control of reproduction. *Endocr. Rev.*, 1: 109-131.

Reiter, R. J. (1991): Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12: 151-180.

Reiter, R. J. (1993): The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 49: 654-664.

Reiter, R. J. (1995): Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.*, 9: 526-533.

Reiter, R.J. (1997): Antioxidant actions of melatonin. *Advances in Pharmacology*, 38: 103-117.

Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J.I., Ortiz, G.G. y Acuña-Castroviejo, D. (1995): A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.* 18: 104-111.

Reiter, R.J., Tang, L., García J.J. y Muñoz-Hoyos, A. (1997): Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology.

Life Science 60 (25): 2255-2271.

Reynolds, E. S. (1963): The use of lead citrate at light pH as electron opaque stain in electron microscopic. *J. Cell. Biol.*, 17: 208.

Rhodes, R.H. (1984). Ultrastructure of Müller cell in the developing human retina. *Graefe's Arch. Ophthalmol.* 221:171-178.

Richardson, K. C., Jarett, L. y Finke, E. H. (1960): Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.*, 35: 313-323.

Rio-Hortega, P. del. (1919). El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglía normal. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos. III. Naturaleza probable de la microglía. *Bol. Soc. Esp: Biol.* 9:69-129.

Robertson, L. M. y Takahashi, J. S. (1988, a): Circadian clock in cell culture: I. Oscillation of melatonin release from dissociated chick pineal cells in flow-through microcarrier culture. *J. Neurosci.*, 8: 12-21.

Robertson, L. M. y Takahashi, J. S. (1988, b): Circadian clock in cell culture: II. Oscillation of melatonin release from dissociated chick pineal cells . *J. Neurosci.*, 8: 22-30.

Robinson, S.R.; Hampson, E.C.G.M.; Munro, M.N. y Vaney, D.I. (1993). Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglía. *Science* 262:1072-1074.

Rodiek, R.W. (1973). The vertebrate retina. Principles of structure and function. Ed. W.H. Freeman and Company. San Francisco.

Rubio, A., Guerrero, J. M., Reiter, R. J. Y Osuna, C. (1993): Involvement of α - and β - adrenergic receptors in the regulation of rat pineal N-acetyltransferase activity during development. *Endocrinology*, 132: 393-398.

Rungger-Brändle, E.; Messerli, J.M.; Niemeyer, G. y Eppenberger, J.M. (1993). Confocal microscopy and computer assisted image reconstruction of astrocytes in the mammalian retina. *Eur. J. Neurosci.* 5:1093-1106.

Sapolsky, R. M. (1992): Stress, the aging brain, and the mechanisms of neuron death. In: 1ª Ed. Massachusetts, London: The MIT Press Cambridge. pp: 117-258.

Sato, K., Kiyama, H. y Tohyama, M. (1993): The differential expression patterns of messenger RNAs encoding non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits (GluR1-4) in the rat brain. *Neuroscience*, 52: 515-539.

Savill, J., Fadok, V., Henson, P. y Haslett, C. (1993): Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today*, 14: 131-136.

Scaiano, J. C. (1995): Exploratory laser flash photolysis study of free radical reactions magnetic field effects in melatonin chemistry. *J. Pineal Res.*, 19: 189-195.

Schnitzer, J. (1988). Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, Müller glial cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina. *Dev. Brain. Res.* 44:59-72.

Schoepp, D.D. y Conn, P.J. (1993): Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends in Pharmacological Sciences* 14: 13-20.

Schoepp, D. D., Tizzano, J. P., Wright, R. A. y Fix, A. S. (1995): Reversible and irreversible neuronal injury induced by intrahippocampal infusion of the mGluR agonist 1S, 3R-ACPD in the rat. *Neurodegeneration*, 4: 71-80.

Schweichel, J. U. y Merker, H. J. (1973): The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*. 7: 253-266.

Searle, J., Kerr, J. F. R. y Bishop, C. J. (1982): Necrosis and apoptosis: Distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.*, 17: 229-259.

Seeburg, P.H. (1993): The molecular biology of glutamate receptor channels. *Trends in Pharmacological Sciences* 14: 297-303.

Sewerynek, E., Melchiorri, D., Ortiz, G.G., Poeggeler, B. y Reiter, R.J. (1995): Melatonin reduces H₂O₂-induced lipid peroxidation in homegenates of different rat brain regions. *J. Pineal Res.* 19: 51-56.

Shaw, P. J., Ince, P. G., Johnson, M. Perry, E. K. y Candy, J. (1991): The quantitative autoradiographic distribution of [³H] MK-801 binding sites in the normal human spinal cord. *Brain Research.*, 539: 164-168.

Shida, C. S., Castrucci, A. M. L. y Lamy-Freund, M. T. (1994): High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal Res.*, 16: 198-201.

Shigemoto, R., Nakanishi, S. y Mizuno, N. (1992): Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: An in situ hybridization study in adult and developing rat. *J. Comp. Neurol.*, 322: 121-135.

Sies, H. (1991): Oxidative stress: Introduction. In: Oxidative stress. Oxidative and antioxidants. Ed: Sies, H. London: Academic Press. pp: 15-17.

Siesjo, B. K., Agardh, C. D. y Bengtsson, F. (1989): Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, 1: 165-211.

Sievers, J.; Parwaresch, R. y Wottege; H.U. (1994). Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes. Morphology. *Glía* 12:245-258.

Somogy, P., Halasky, K., Somogy J., Storm-Mathisen, J y Ottersen, O.P. (1986): Quantification of immunogold labeling reveals enrichment of glutamate in mossy and parallel fiber terminals in cat cerebellum. *Neuroscience* 19:1045-1050.

Sotelo, C. (1975): Dendrites abnormalities of Purkinje cells in the cerebellum of neurologic mutant mice (weaver and staggerer). In: *Physiology and Pathology of Dendrites. Advances in Neurobiology*. Vol. XII. Ed. G. W. Kreutzberg. Raven Press. pp: 335-351. New York.

Su T.-Z., Campbell, G. W. y Oxender, D. L. (1997): Glutamine transport in cerebellar granule cells in culture. *Brain Research.*, 757: 69-78.

Spurr, A. R. (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 26: 31-43.

307:548-550.

Sschwartzman, R. A. y Cidlowski, J. A. (1993): Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.*, 14: 133-151.

Stefansson, K.; Molnar, M.L.; Marton, L.S.; Molnar, G.K.; Mihovilovic, M.; Tripathi, R.C. y Richman, D.P. (1984). Myelin-associated glycoprotein in human retina. *Nature*

Steller, H. (1995): Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267: 1445-1449.

Stone, J. y Dreher, Z. (1987). Relationship between astrocytes, ganglion cells and the vasculature of the retina. *J. Comp. Neurol.* 255:35-49.

Storm-Mathisen, J., Ottersen, O. P. y Fu-Long, T. (1986): Antibodies for the localization of excitatory amino acids. In: Excitatory amino acids. Ed: Roberts, P. J., Storm-Mathisen, P.J. y Bradford, H. F. London: Macmillan. pp: 101-116.

Tan, D.X., Chen, L.D., Poeggeler, B., Manchester, L.C. y Reiter R.J. (1993):

Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1: 57-60.

Thanos, S. (1992). Sick photoreceptors attract activated microglía from the ganglion cell layer: a model to study the inflammatory cascades in rats with inherited retinal dystrophy. *Brain Res.* 588:21-28.

Theele, D.P. y Streit, W.J. (1993). A chronicle of microglial ontogeny. *Glía* 7:5-8.

Triviño, A.; Ramírez, J.M.; Ramírez, A.I.; Salazar, J.J. y García-Sánchez, J. (1992). Retinal perivascular astroglía: an immunoperoxidase study. *Vision Res.* 32:1601-1607.

Uchiyama-Tsuyuki, Y., Araki, H., Yae, t. y Otomo, S. (1994): Changes in the extracellular concentrations of amino acids in the rat striatum during transient focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.*, 62: 1074-1078.

Underwood, H., Barrett, R. K. y Siopes, T. (1990): The quail's eye: a biological clock. *J. Biol. Rhythm*, 5: 257-265.

Vakkuri, O. (1985): Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. *Acta Physiol Scand*, 23: 151-158.

Venable, J. H. y Coggeshall, R. (1965): A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 25: 407.

Walker, N. I., Harmon; B. V., Gobé, G. C. y Kerr, J. F. R. (1988): Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.*, 13: 18-54.

Watanabe, T. y Raff, M.C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* 332:834-837.

Watanabe, M., Mishina, M. y Inoue, Y. (1994): Distinct spatiotemporal expressions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, 343: 513-519.

Weiler, R. y Schultz, K. (1993): Ionotropic non-NMDA agonists induce retraction of dendritic spinules from retinal horizontal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 6533-6537.

Weissbach, H. Y Axelrod, J. (1960): The enzymatic biosynthesis of melatonin. *Fed. Proc.*, 19, 50.

Weissbach H., Redfield, B. Y Axelrod, J. (1960): Biosynthesis of melatonin. Enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochim. Biophys.*

Acta 43, 352.

Williams, R. W. y Herrup, K. (1988): Control of cell number in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 11: 423-453.

Williams, P.L. y Warwick, R. (1975): Functional Neuroanatomy in man. *Churchill Livingstone*. Edinburgh. London. New York.

Wisden, W. y Seeburg, P.H. (1993): Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr. Opin., Neurobiol.* 3: 291-293.

Wolter, J.R. (1956). Die struktur der papille des menschlichen auges. *Graefes Archiv. fr Ophthalmologie, Bd.* 158:268-276

Wood, K. A. y Youle, R. J. (1994): Apoptosis and free radicals. *Ann. NY Acad. Sci.*, 738: 400-407.

Woodward, D.J., Byckett, B. y Chanda, R. (1975): Purkinje cell dendritic alterations after transient developmental injury of the external granular layer. *Brain Res.*, 97: 195-214.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F. y Currie, A. R. (1980): Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68: 251-306.

Young, A. B. y Fagg, G. E. (1990): Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *Trends in Pharmacological Sciences.*, 11: 126-133.

Yun, H-Y., Dawson, V. L. y Dawson, T. M. (1997): Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Molecular Psychiatry*, 2: 300-310.

Zatz, M., Mullen, D. A. y Moskal, J. R. (1988): Photoendocrine transduction in cultured chick pineal cells: Effects of light, dark, and potassium on the melatonin rhythm. *Brain Res.*, 438: 199-215.

Zawilska, J. B. (1996): Melatonin as a chemical indicator of environmental light-dark cycle. *Acta Neurobiol.* 56: 757-767.

Zawilska, J. B. e Iuvone, P. M. (1992): Melatonin synthesis in chicken retina: Effect of kainic acid-induced lesion on the diurnal rhythm and D₂-dopamine receptor-mediated regulation of serotonin N-acetyltransferase activity. *Neurosci. Lett.*, 135: 71-74.

Zhao, H.-M., Wenthold, R. J., Wang, Y.-X. y Petralia, R. S. (1997): δ -Glutamate receptors are differentially distributed at parallel and climbing fiber synapses on Purkinje cells. *J. Neurochem.*, 68: 1041-1052.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

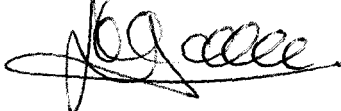
Después el Tribunal Integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. EVA M^a ISORNA PELÁEZ

titulada Efecto neuroprotector de la melatonina sobre el
desarrollo neuroglial de la retina en embriones de pollo
tratados con glutamato.

acordó otorgarle la calificación de sobresaliente cum laude
por unanimidad (cinco votos).

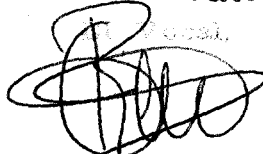
Sevilla, 16 de noviembre, 2004

El Vocal.



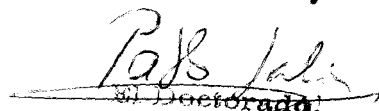
El Presidente

El Vocal.



El Secretario.

El Vocal.



El Doctorado.

