

DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE OJOS COMPUESTOS DE *Orthemis ferruginea* (Fabricius) (ANISOPTERA: LIBELLULIDAE) Y DE *Enallagma civile* (Hagen) (ZYGOPTERA: COENAGRIONIDAE)

Jaret Irais Martínez-López², María del Pilar Villeda-Callejas¹✉, Héctor Barrera-Escorcía², Gustavo Domínguez-Rocha¹, José Ángel Lara-Vázquez¹ y G. E. Daleth Guedea-Fernández²

¹Laboratorio de Zoología. ²Laboratorio de Microscopía. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de Los Barrios Número 1, Los Reyes Iztacala, C. P. 54090, Tlalnepantla, Estado de México.

✉Autor de correspondencia: mapili_villeda@yahoo.com.mx

RESUMEN. Los odonatos son grandes depredadores aeroterrestres, esta capacidad se encuentra relacionada directamente con el tamaño de sus fotorreceptores. Los objetivos principales de este trabajo fueron describir la estructura de los ojos compuestos en odonatos adultos y la selección de técnicas de tinción y mejores tiempos de exposición al colorante. Se realizó técnica histológica a ojos compuestos de *Enallagma civile* y *Orthemis ferruginea*, tiñéndose con hematoxilina-eosina y argéntica; por separado y empleándose para la observación el microscopio de contraste de fases con filtros verde y azul. A nivel de arreglo histológico, se encontró que los ojos compuestos en *O. ferruginea* y *E. civile* presentaron los mismos componentes celulares pero con algunas variaciones: se localizaron células corneógenas bien definidas, los conos cristalinos presentan un acomodo heterogéneo, siendo de tamaños distintos en *O. ferruginea*, las medidas del rábdom fueron 540 μm y 251 μm , respectivamente. El uso del filtro azul en microscopía de contraste de fases resalta mejor a la tinción con hematoxilina y eosina; mientras que el filtro verde realiza lo mismo pero con la tinción argéntica.

Palabras clave: Odonata, tinción argéntica, microscopía de contraste de fases.

Histologic description of the compound eyes of *Orthemis ferruginea* (Fabricius) (Anisoptera: Libellulidae) and *Enallagma civile* (Hagen) (Zygoptera: Coenagrionidae)

ABSTRACT. Odonates are large airborne predators, this ability is directly related to the size of their photoreceptors. The main objectives of this work were to describe the structure of the compound eyes in adult odonates and the selection of staining techniques and better exposure times to the dye. Histological technique were done in the compound eyes of *Enallagma civile* and *Orthemis ferruginea* staining with Hematoxylin-eosin and Argentic Impregnation, separately and using phase contrast microscope observation blue and green filters. At the level of histological arrangement, it was shown that the compound eyes in *O. ferruginea* and *E. civile* presented the same cellular components but with some variations: well-defined corneogenic cells were located, the crystalline cones have a heterogeneous arrangement, being of different sizes in *O. ferruginea*, the measurements of the rabdom were 540 μm and 251 μm , respectively. The use of the blue filter in phase contrast microscopy highlights better staining with Hematoxylin and Eosin; while the green filter does the same but with the silver stain.

Keywords: Odonata, silver stain, phase contrast microscopy.

INTRODUCCIÓN

Los odonatos adultos presentan una gran agudeza ocular; es conocido que su campo visual es cercano a los 360°, pueden ver en todas las direcciones exceptuando detrás de la cabeza debido a que las alas y su cuerpo le interrumpen la visión. Las libélulas exhiben las adaptaciones morfológicas más conspicuas y mejor desarrolladas para el forrajeo aéreo, siendo las de mayor importancia las relacionadas con el vuelo y la visión; en relación con el orden Protodonata cuyo aspecto era muy similar al de los odonatos, presentaban ojos compuestos muy pequeños en comparación con la cabeza y el cuerpo de los odonatos actuales (Corbet, 1999).

Los ojos compuestos representan el órgano visual más prominente e importante en la mayoría

de los insectos, en los odonatos se encuentran muy desarrollados, presentan aproximadamente 30,000 omatidios, se debe en gran medida a que son grandes depredadores aeroterrestres y requieren de una alta resolución espacial gracias a que sus fotorreceptores son capaces de ajustar los cambios en la escena visual; las libélulas son particularmente buenas viendo objetos pequeños. Otra modalidad visual que ha sido adaptable a lo largo de la evolución de los insectos es la habilidad para detectar la dirección del componente del campo eléctrico y la luz polarizada, permitiendo la orientación, la detección de cuerpos de agua y la comunicación; esta región especializada para la visión de luz polarizada se encuentra en el área dorsal del borde conocida como rim de la retina, siendo un componente antiguo en los insectos registrado desde el orden Odonata, hasta algunos Orthoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Diptera (Buschbeck y Friedrich, 2008).

Ninomiya *et al.*, (1969) se han encargado de describir, a través de cortes histológicos, la estructura y acomodo de los omatidios en diversas especies de adultos; Laughlin y Mc. Ginnes (1978) estudiaron las regiones dorsal y ventral de la retina en ojos compuestos de odonatos; Meyer y Labhart (1993) describen a través de microscopía electrónica el área dorsal rim en las regiones ventral y dorsal de los ojos compuestos de adultos.

El presente trabajo tiene como objetivos describir comparativamente la estructura celular de los ojos compuestos en adultos de *Orthemis ferruginea* y *Enallagma civile*, seleccionar técnicas de tinción y tiempos de exposición al colorante para resaltar los componentes celulares en los ojos compuestos y observar si existen diferencias en los cortes histológicos utilizando diferentes filtros en el microscopio de contraste de fases.

MATERIALES Y MÉTODO

Los organismos se recolectaron mediante una red entomológica aérea en diferentes cuerpos de agua lénticos, el primer lugar de colecta se ubicó en dos puntos de la Sierra de Guadalupe, Ecatepec de Morelos: la Laguna de los Nueve Ahogados y la Barranca de las Venitas; el segundo lugar se ubicó en una laguna cercana a la zona arqueológica de Xochicalco, Morelos. Los odonatos se separaron en dos grupos: los utilizados para la determinación taxonómica se fijaron con acetona pura mediante inyección en el tórax; para conservar su coloración, posteriormente se introdujeron en bolsas de papel glassine, dejándolos sumergidos por 24 horas en el mismo fijador, lo que permitió la conservación en seco en las mismas bolsas debidamente etiquetadas; los organismos que se ocuparon para la técnica histológica fueron fijados con solución de Bouin mediante inyección en el tórax e inmersión durante un día. El material colectado se trasladó al Laboratorio de Microscopía de la FES Iztacala, UNAM para ser determinados mediante claves especializadas (Needham y Westfall, 1954; Usinger, 1956).

Las cabezas desprendidas de los zigópteros y anisópteros fueron colocadas por separado en frascos de vidrio, para realizarles un lavado con agua corriente por goteo, dejándolas en etanol al 70 % durante 48 horas con recambios constantes. El tejido fue deshidratado mediante alcoholes graduales hasta el absoluto, finalmente se dejaron reposar en alcohol amílico durante 24 horas. Posteriormente se incluyeron en paraplást realizándose los cortes histológicos seriados con un espesor de 7 a 10 μm en un microtomo American Optical modelo 820, montándose en porta objetos y así realizar preparaciones semipermanentes. Para la tinción se eligieron la técnica argéntica mediante goteo con solución acuosa de nitrato de plata al 2 %, probando los siguientes tiempos de exposición: 5 min, 15 min, 30 min, 45 min y 1 hora, y la de hematoxilina-eosina, siguiendo el método de Luna (1968). Finalmente, los cortes fueron montados con Entellan. Las preparaciones fueron observadas con microscopio óptico Motic B Mod. BI-223, empleando los objetivos 4X, 10X y 40X. Para la técnica de microscopía de contraste de fase se utilizó un microscopio de epifluorescencia y contraste de fases LEICA con los objetivos 10X, 20X y 40X. Las imágenes se

fotografiaron con una cámara Moticam 2000, usando el programa Motic (para XP), cámaras digitales Nikon Coolpix S4400 y Canon PowerShot Elph 190 IS; finalmente se realizó su interpretación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al probar diferentes tiempos de exposición a la solución acuosa de nitrato de plata, se observó que la exposición a 45 min fue la mejor, debido a que resalta con mayor detalle los componentes celulares del corte, facilitando la observación del tejido. Las especies estudiadas presentan varias similitudes en el arreglo histológico de sus ojos, sin embargo, existen particularidades que diferencian a cada especie, las cuales son descritas a continuación:

En la figura 1 A se presenta un macho adulto de *Orthemis ferruginea*, en la 1 B se muestra el corte histológico longitudinal y ligeramente oblicuo teñido con Hematoxilina y Eosina (H-E) desde la parte externa hacia la interna, se diferencia el rábdom en un tono más claro, el cual se localiza debajo de los conos cristalinos y se encuentra rodeado de las células de la retina (transparentes en la imagen), existe la presencia de una membrana basal fenestrada, en la que las tráqueas muestran tener un tamaño diferente. En la parte más interna se observa al nervio óptico teñido en tonos claros y oscuros, así como algunas reminiscencias de la parte que conforma al ganglio nervioso.

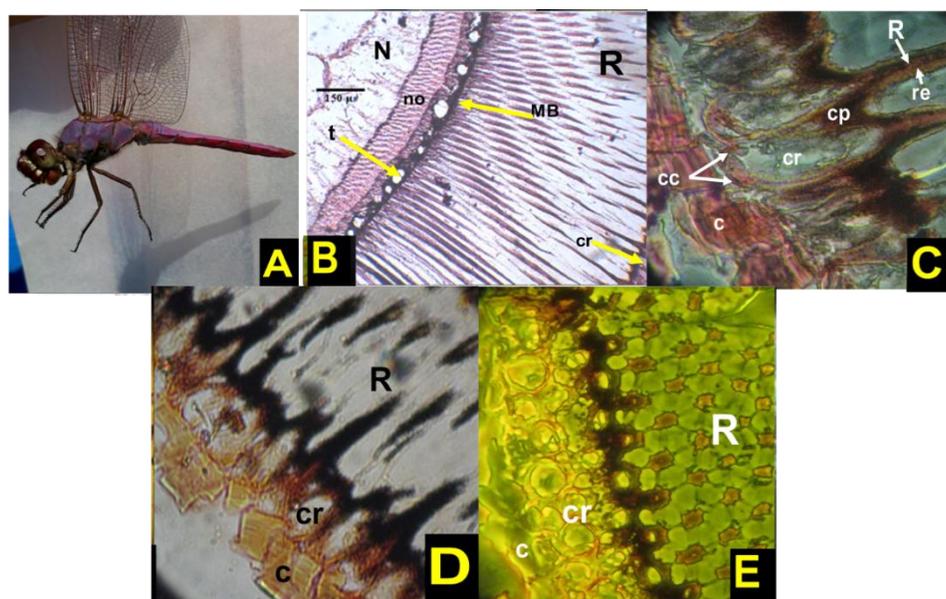


Figura 1. A: *Orthemis ferruginea*. B: Corte histológico longitudinal y oblicuo teñido con H-E donde se observa: cr: cono cristalino (57 μm y 67 μm); R: rábdom (540 μm); MB: membrana basal; t: tráqueas; no: nervio óptico (237 μm); N: ganglio nervioso (Imagen a 10X). C: Corte longitudinal teñido con H-E observado en microscopía de contraste de fases, utilizando filtro azul en el que se observa: c: córnea; cc: células corneógenas; cr: cono cristalino; cp: células pigmentarias; R: rábdom; re: células de la retina (Imagen a 40X). D: Corte longitudinal teñido con nitrato de plata en el que se observa: c: córnea; cr: cono cristalino; R: rábdom (Imagen a 40X). E: Corte transversal teñido con nitrato de plata en microscopía de contraste de fases, observando: c: córnea; cr: cono cristalino, R: rábdom (Imagen a 10X).

Al observar un corte teñido con H-E con el uso del filtro azul en la microscopía de contraste de fases se observa la córnea, en la parte superior de los conos cristalinos se aprecian las células corneógenas y, a pesar de no ser tan evidentes a los lados, se logran ver algunas células pigmentarias; se distingue con mayor facilidad el rábdom y las células de la retina (Fig. 1C). En el corte teñido con nitrato de plata, con una disposición longitudinal y ligeramente oblicua, se aprecia

la córnea en un tono dorado desprendida de algunas partes, los conos cristalinos mostrando un acomodo heterogéneo y diferentes dimensiones; pero manteniendo la forma típica de una pirámide invertida; la región del rábdom se encuentra teñida en un tono negro, debido a la gran afinidad que presenta este tipo de células al nitrato de plata (Fig. 1D). En el corte transversal teñido con nitrato de plata, observado en microscopía de contraste de fases utilizando filtro verde, se observa la córnea como una capa gruesa, los conos cristalinos con una forma circular y con tamaños diferentes, son mucho más brillantes con el uso de este filtro; posteriormente se observa el rábdom en un tono oscuro y rodeado por las células de la retina en forma de rosetas (Fig. 1E).

La Fig. 2 A, muestra una hembra adulta de *Enallagma civile*. Las figuras 2 B y C presentan el corte longitudinal del ojo compuesto teñido con H-E, se observa, del exterior al interior, la presencia de la córnea completa, formada por una sola capa de células y teñida en un tono rosa claro, la presencia de los conos cristalinos que son ligeramente más alargados y presentan un acomodo heterogéneo, a cada lado en la parte superior se encuentran las células corneógenas y por el contrario en la parte inferior están ubicadas las células formadoras del cono cristalino. Posteriormente, la retina ocupa una gran área dentro del corte; la membrana basal (fenestrada) teñida en un tono más oscuro; no es muy gruesa. El nervio óptico está ligeramente desprendido y su unión al ganglio nervioso del protocerebro.

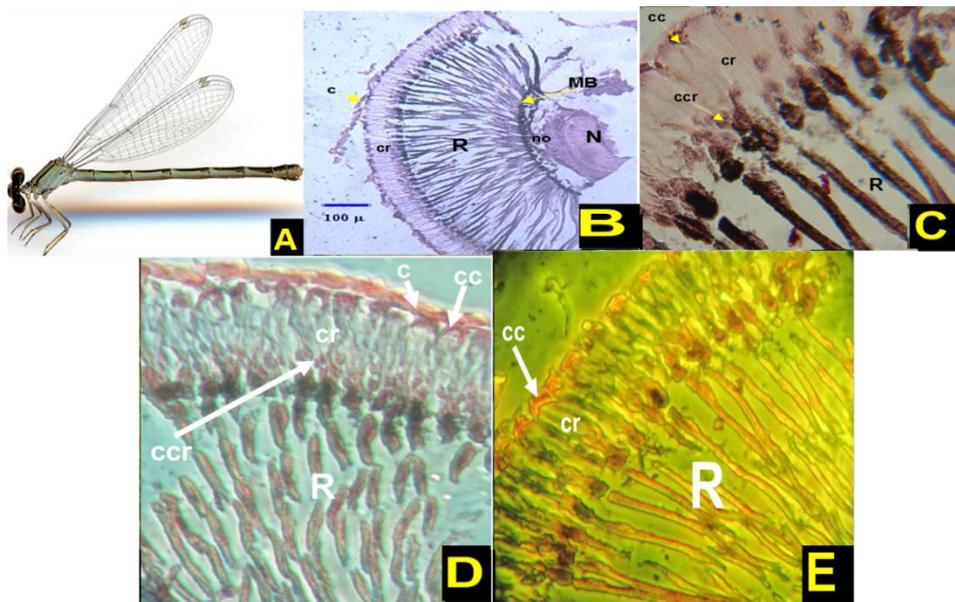


Figura 2. A: *Enallagma civile* (Foto por Haber, 2006). B y C: Cortes longitudinales en donde se observa del exterior al interior: c: córnea, cc: células corneógenas, cr: cono cristalino (66.5μ), ccr: células formadoras del cono cristalino, R: rábdom (251.2μ), MB: membrana basal, no: nervio óptico, N: ganglio nervioso; (B: Imagen observada a 10X; C: Imagen observada a 40X). D y E: Cortes longitudinales observados con microscopía de contraste de fases, utilizando filtro azul y filtro verde, respectivamente, donde se detalla: c: córnea; cc: células corneógenas; cr: cono cristalino; ccr: células formadoras del cono cristalino; R: rábdom; (Imágenes observadas a 20X).

Al usar el filtro verde en la técnica de microscopía de contraste de fases en un corte histológico longitudinal y oblicuo (Fig. 2D) permite la diferenciación de las células corneógenas en un tono rosa brillante, los conos cristalinos brillantes que presentan un arreglo heterogéneo pero con las mismas dimensiones. Los rhabdoméros se aprecian como haces de luz brillante. Por el contrario, con el uso del filtro azul se observa claramente la córnea como una capa muy delgada en tono rosa claro brillante, los conos cristalinos bien definidos, en la parte superior se encuentran las células

corneógenas teñidas en tono rosado y en la parte inferior a las células formadoras del cono cristalino. La región del rábdom se observa en tono rosado con haces de luz brillante hacia cada lado (Fig. 2E).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que la tinción con nitrato de plata permite una mejor diferenciación del rábdom así como el entramado de unión de las células de la retina al nervio óptico, al trabajar con técnicas argénticas se permite la diferenciación de estructuras inervadas por fibras nerviosas debido a que la plata se fija con facilidad a las mismas, confirmando lo que señala Luna (1968).

En este trabajo se empleó la microscopía de contraste para observar estructuras celulares en un ojo compuesto. Sánchez (2011) indica que algunos autores recomiendan esta técnica para el estudio morfológico de artrópodos. En la revisión realizada no se encontraron trabajos que la hayan empleado, sin embargo, dicho autor considera que es una gran herramienta en el estudio morfológico, principalmente de muestras no foto absorbentes y que ofrecen al investigador imágenes bastante llamativas. Es importante mencionar que el filtro azul resalta mejor las estructuras celulares teñidas con Hematoxilina y Eosina; mientras que el filtro verde funciona mejor al resaltar estructuras teñidas con Nitrato de Plata.

En el zigóptero *E. civile* y en el anisóptero *O. ferruginea* se observó que existe un acomodo heterogéneo en los conos cristalinos, al presentar varias inserciones en ciertas regiones; pero difieren en la longitud de los conos, en *E. civile* todos tienen las mismas dimensiones; por el contrario, en *O. ferruginea* las dimensiones son diferentes. Esto concuerda con lo encontrado por Villeda *et al.* (2013), quien reporta el caso particular de *Hetaerina americana* (Zygoptera), donde el acomodo del cono cristalino es heterogéneo, así mismo menciona que no se había reportado en ninguna publicación sobre la histología del ojo compuesto para odonatos u otros insectos. Se infiere que posiblemente existan factores evolutivos que estén estrechamente relacionados con este acomodo, en particular de los ojos compuestos, por lo que sería importante seguir investigando en diferentes especies de odonatos para saber si es un patrón constante.

CONCLUSIÓN

Se determinó que el mejor tiempo de exposición con la técnica argéntica de nitrato de plata es de 45 minutos; así mismo que esta técnica es buena para resaltar los componentes nerviosos en el ojo compuesto, detallando muy bien la zona del rábdom y las rosetas de las células de la retina.

Mediante la técnica histológica se encontró que ambas especies presentan un acomodo heterogéneo de los conos cristalinos, pero difieren en las dimensiones, siendo en *O. ferruginea* de tamaño variable.

Finalmente, con el uso de la técnica de microscopía de contraste de fases se permitió diferenciar mejor algunas estructuras celulares en el ojo compuesto de acuerdo a las siguientes combinaciones: filtro azul-Hematoxilina y Eosina, y filtro verde-tinción argéntica.

Literatura Citada

- Buschbeck, E. K. and M. Friedrich. 2008. Evolution of the insect eyes: Tales of ancient heritage, deconstruction, reconstruction, remodeling, and recycling. *Evolution: Education and Outreach*, 1: 448–462.
- Corbet, P. S. 1999. *Dragonflies, Behavior and Ecology of Odonata*. Cornell University Press: New York. 829 pp.
- Haber, W. A. 2006. *Dragonflies and Damselflies (Odonata) of Monteverde, Costa Rica: Enallagma civile female*. University of Massachusetts, Boston. Disponible en: <http://efg.cs.umb.edu/monteverde/Ode/Coenagrionidae/Enallagma-civile-f-813-1e14.jpg>.

- Laughlin, S. and S. McGinnes. 1978. The structures of dorsal and ventral regions of a dragonfly retina. *Cell Tissue Research*, 188: 427–447.
- Luna, L. G. 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. McGraw Hill, USA. 258 pp.
- Meyer, P. E. and T. Labhart. 1993. Morphological specialization of dorsal rim ommatidia in the compound eye of dragonflies and damselflies (Odonata). *Cell Tissue Research*, 272: 17–22.
- Needham, J. and M. J. Jr. Westfall. 1954. *A manual of the dragonflies of North America (Anisoptera) including the Greater Antilles and the provinces of the Mexican border*. University California Press: Berkeley. 615 pp.
- Ninomiya, N., Tominaga, Y. and M. Kuwabara. 1969. The fine structure of the compound eye of a Damselfly. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie. Abteilung Histochemie*, 98: 17–32.
- Ramírez, A. 2010. Odonata. *Revista de Biología Tropical*, 58: 97–136.
- Sánchez, M. G. A. 2011. Algunas notas sobre el uso de técnicas de microscopía en la taxonomía de artrópodos. *Métodos en Ecología y Sistemática*, 6(3): 53–61.
- Usinger, R. 1956. *Aquatic Insects of California: with keys to North American genera and California species*. USA: University of California Press. 508 pp.
- Villeda, C. M. P., Rojas, F. V. L., Barrera, E. H., Lara, V. J. A., Guedea, F. D. y P. P. Ruiz. 2013. Histología comparativa de ojos compuestos de *Hetaerina americana* (Calopteroidea: Zygoptera) y *Brechmorhoga mendax* (Libellulidae: Anisoptera). Pp. 1442–1448. In: A. Equihua-Martínez, E. G. Estrada-Venegas, J. A. Acuña-Soto y M. P. Chaires-Grijalva. *Entomología mexicana* Vol. 12, Tomo 2. Colegio de Postgraduados y Sociedad Mexicana de Entomología, Texcoco, estado de México