

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE HUMANIDADES Y CIENCIAS

Dpto. de Biología Celular

Profundización: Diferenciación Celular

Prof. Dr. Roberto B. García

Orientador: Dr. O. Trujillo-Cenóz

ALGUNOS ASPECTOS DE LA DIFERENCIACION CELULAR DE LOS
FOTORRECEPTORES DEL OJO COMPUESTO DE Apis mellifera.

Anabel Fernández Constenla.

1986.

INDICE

	PAG.
I-INTRODUCCION	1
I-1 Estructura General del Ojo Compuesto de <u>Apis mellifera</u>	4
II-MATERIALES Y METODOS	6
II-1 Etapas del desarrollo de <u>Apis mellifera</u>	6
II-2 Técnicas Histológicas	7
II-2-1 Técnicas de Microscopía Electrónica	7
II-2-2 Técnicas Cromo-Argentícas	10
III-RESULTADOS	12
III-1 Diferenciación de los fotorreceptores	12
III-1-1 Fase Larval	12
III-1-2 Fase Ninfal	16
III-1-3 Fase Adulta	19
IV-DISCUSSION	22
AGRADECIMIENTOS	29
BIBLIOGRAFIA	30
V-FIGURAS Y LEYENDAS	35

I-INTRODUCCION

Los mecanismos por los cuales una única célula (cigoto) da origen por medio de sucesivas mitosis, a estirpes celulares diferentes, ha motivado a lo largo de la historia, el interés de numerosos investigadores. El fenómeno de la "diferenciación celular" se estudió primero con técnicas morfológicas (García, 1983). La introducción de nuevas técnicas permitió demostrar que en terminos moleculares, el proceso comienza antes que se evidencien cambios estructurales. Hoy se acepta que la diferenciación celular es controlada a través de una progresiva activación génica, la que a su vez desencadena complejas y sucesivas síntesis proteicas.

Si se considera en particular la diferenciación del sistema nervioso, es necesario contemplar dos aspectos de importancia general: por un lado la expresión típicamente morfológica de la diferenciación, que incluye el desarrollo del axon, las dendritas y los componentes citoplásmicos de la neurona (grupos de Nissl, neurotúbulos, neurofilamentos etc.); por otro, un aspecto esencialmente topológico que involucra la ordenación espacial de las células y de sus terminaciones sinápticas.

Los dos aspectos anteriormente mencionados - morfológico y topológico- pueden ser bien analizados durante el desarrollo de las células fotorreceptoras del ojo compuesto de los insectos. Este órgano muestra una organización

extremadamente ordenada, calificada de "red neurocristalina" por Ready (Ready et al, 1976). Es resultante de la sumación de módulos o unidades pluricelulares que se repiten en forma periódica. Esta organización modular facilita la exploración anatómica de las conexiones neurales, tanto en el estado adulto como durante el desarrollo.

En la retina madura, existen módulos periféricos - las omatidias- que constituyen en la mayoría de las especies de insectos, unidades anatomo-funcionales formadas por fotorreceptores y otros elementos no neurales. Cada fotorreceptor posee en su segmento distal, estructuras especializadas para la captación de la luz, y en su polo proximal, (referido al sistema nervioso) estructuras especializadas para la comunicación interneuronal (sinapsis). A nivel de los neuropilos sinápticos también existen módulos, mas o menos individualizables según las especies: los "cartuchos ópticos" de Cajal y Sánchez (1915) . Los insectos holometábolos, ofrecen ventajas de índole experimental, que los convierte en opciones óptimas cuando se intenta estudiar el desarrollo de los órganos sensoriales (Trujillo-Cenóz, 1985). Este proceso ocurre luego de la eclosión de la larva, la que pasa por diferentes estadios identificables por su apariencia externa. En las larvas existen agrupaciones celulares a modo de sacos o discos, (discos imaginales) que representan los esbozos o primordios de los órganos del adulto. Las células que los constituyen derivan del ectodermo embrionario y son las únicas que en la

larva poseen capacidad mitótica (las otras estirpes de células larvales reduplican su ADN pero no se dividen). En la larva de la abeja las células imaginales, no se agrupan adoptando forma de disco, como se ve en los dípteros. Se acepta sin embargo el término de "tejidos imaginales" (Myser 1954) para denominar a los primordios de los órganos. En las larvas de penúltimo estadio, los futuros ojos compuestos se identifican como dos masas celulares ovaladas que yacen a los lados del cerebro larval, estableciendo íntimo contacto con el mismo.

El desarrollo del ojo compuesto de Apis mellifera ha sido poco estudiado y no existen trabajos realizados con técnicas modernas. Por el contrario, la estructura del ojo compuesto maduro es relativamente bien conocida ya que fue objeto de estudio de investigadores de la talla de Kenyon y Cajal (Kenyon, 1897 y Cajal y Sánchez, 1915). Posteriormente Varela y Porter (1969), Ferrelet (1969) y Ribí (1975-1979) exploraron el ojo compuesto de Apis utilizando técnicas de microscopía electrónica.

Los primeros aportes sobre el desarrollo de Apis mellifera fueron publicados por Philips en 1905. Este usó la hematoxilina férrica como principal método de tinción tisular. Observó que en etapas larvales tempranas es posible distinguir en el primordio del ojo compuesto, agrupaciones celulares en forma de unidades independientes. Estos grupos celulares indicarían el comienzo de la diferenciación de la futura omatidia (protomatidia). Es de hacer notar que

Philips no aportó datos referentes al desarrollo de los componentes neurales del ojo compuesto.

El presente trabajo trata de los aspectos morfológicos que expresan la diferenciación celular de los fotorreceptores de abeja, desde el estadio de células epiteliales hasta el momento que completan su madurez, incluyendo la diferenciación del polo sináptico. Es a ese nivel que se define la maduración circuital del sistema.

Los datos que aquí se aportan, serán comparados con aquellos ya conocidos derivados del estudio del desarrollo de otras especies de insectos holometábolos, particularmente lepidópteros, (Sánchez y Sánchez, 1916) y dípteros (Cajal, 1909; Cajal y Sánchez, 1915; Melamed y Trujillo-Cenóz, 1975; Trujillo-Cenóz, 1982 y Meinertzhagen, 1973).

Con el propósito de definir términos y conceptos, se ha considerado pertinente, incluir en esta introducción una somera descripción de la estructura del ojo del adulto. También se ha incluido con la misma intención, en el capítulo de Materiales y Métodos, un resumen de las etapas del desarrollo de la abeja obrera.

I-1 Estructura General del Ojo Compuesto de Apis mellifera.

Los ojos compuestos de la abeja obrera se encuentran localizados fronto-lateralmente y ocupan casi toda la longitud de la cabeza. En sus superficies se observan numerosos pelos interpuestos entre las omatidias.

Cada ojo consta de dos regiones principales: una fotorreceptora (la retina) y otra de naturaleza neural, íntimamente vinculada al cerebro. Esta región neural contiene tres zonas, correspondientes a tres niveles fundamentales de conexión sináptica, que de acuerdo a la terminología introducida por Bullock y Horridge (1965), se denominaron lamina, medulla y lobula (fig.1).

La retina está compuesta aproximadamente por 4000 omatidias, formada cada una, por nueve células fotorreceptoras (Ribi, 1975), que se proyectan a la lamina y a la medulla por medio de axones cortos y largos respectivamente (fig.2) (fibras visuales cortas y largas de Cajal y Sánchez, 1915). Desde la superficie medial interna de cada fotorreceptor, se extienden microvellosidades muy regulares, que contribuyen a la formación de un rabadoma central único. Se acepta actualmente que el rabadoma es el lugar donde se localizan los pigmentos visuales (Langer y Thorell, 1966). Cada unidad u omatidia, tiene además un cono cristalino, una lente corneal y diversos tipos de células pigmentarias. Cabe señalar que la información referente al número y tipos de células pigmentarias es todavía incompleta.

II- MATERIALES Y METODOS

La especie utilizada en este trabajo fué la abeja comun Apis mellifera. Se usaron larvas, ninfas y adultos de obreras colectadas en varias colmenas y en diferentes épocas del año.

II-1 Etapas del Desarrollo de Apis mellifera.

El período embrionario dura aproximadamente tres días, a partir de la oviposición. Del huevo eclosiona una pequeña larva (1,6mm) que crece rapidamente; la etapa larvaria abarca seis días, y en este período ocurren cinco mudas.

En el cuarto estadio (a partir de la cuarta muda), la larva ocupa toda la celda y comienza a hilar el capullo. Las abejas nodrizas construyen el opérculo que oblitera la celda, y el insecto transcurre allí un período de reposo de dos días, correspondiente a la llamada fase prepupal. Cuando se produce la quinta muda, comienza la pupación o período ninfal. Al cabo de ocho nueve días tiene lugar la sexta y última muda de la cual emerge el imago luego de cuatro o cinco días.

Los datos aquí mencionados, han sido obtenidos del completo trabajo de Myser, (1954) y del libro de Snodgrass, (1956).

II-2 Técnicas Histológicas.

II-2-1 Técnicas de Microscopia Electrónica.

Los tejidos larvales, ninfales y adultos, fueron fijados previa disección, en una de las siguientes soluciones:

- | | | |
|----------------------------|-------|-------|
| 1) Paraformaldehído 10% | ----- | 5ml |
| Glutaraldehído 70% | ----- | 0,5ml |
| Buffer Fosfato pH7,3 | ----- | 5ml |
| 2) Bicromato de potasio 5% | ----- | 10ml |
| Hidróxido de potasio 2,5N | ----- | 1,2ml |
| Tetróxido de Osmio 4% | ----- | 3ml |

(esta última solución se conoce con el nombre de fijador de Dalton) (Sjöstrand, 1967)

El material fijado en la solución dialdehídica, se mantuvo en la misma durante dos horas y luego de sucesivos lavados en solución tamponada de fosfato según Sorensen (Sjöstrand, 1967), se procedió a su osmificación (OsO₄ al 1% en la misma solución tamponada). El tiempo de osmificación varió entre 30 y 60 minutos. Cuando se utilizó la mezcla de Dalton la fijación se realizó en una sola etapa, ya que esta solución fijadora contiene OsO₄.

Todos los especímenes, independientemente del fijador utilizado, experimentaron un idéntico proceso de inclusión. La deshidratación se realizó en alcoholes de graduación creciente, y previo pasaje por acetona al 100% (1 hora), el material se incluyó en resina epóxica (Durcupam AMC, Fluka).

Se procedió luego a la obtención de cortes cuyos espesores variaron entre 1 y 2 micras que fueron examinados, previa tinción con azul de metileno boraxico, bajo un microscopio de luz. Este procedimiento permite seleccionar el área que posteriormente será estudiada con el microscopio electrónico. Los cortes ultrafinos (500-1000 Å), se obtuvieron con un microtomo LKB-Ultratome, provisto de cuchillas de vidrio. Antes de obtenerlos se procedió a un preciso "tallado" del área seleccionada. Las series de cortes se recogieron en grillas de ranura (1 x 2 mm) y se depositaron sobre una membrana de soporte constituida por polivinilformal. Los tejidos fueron doblemente teñidos con acetato de uranio y citrato de plomo en atmósfera de nitrógeno (10 minutos). Para la obtención de las micrografías electrónicas se usaron indistintamente dos microscopios electrónicos (modalidad de transmisión) manufacturado por Siemens (Siemens 1B) o Jeol (Jem CX 100). Los negativos fueron ampliados en un equipo marca Durst provisto de objetivos intercambiables. Se utilizaron comunmente papeles fotosensibles de contraste medio.

Es pertinente hacer notar que la estabilización de las membranas celulares de los tejidos larvarios de abeja, plantean serias dificultades. Se obtuvieron preservaciones calificables como aceptables sólo en las regiones periféricas de las piezas. Este fenómeno es particularmente notorio cuando se usa el fijador de Dalton. La mezcla dialdehídica, que en otras especies brinda una

estabilizacion satisfactoria de las membranas, en los tejidos larvales de la abeja solo permite alcanzar resultados mediocres. En este contexto general, las mayores dificultades las ofrecen los neuropillo sinápticos. Sólo en pocas ocasiones y de manera irregular, se hallaron en la masa tisular, zonas bien preservadas.

II-2-2 Técnicas Cromo-Argentícas

Bajo este subtítulo se incluyen un conjunto de variantes de la técnica original de Golgi (Cajal y Castro 1972) adaptadas al sistema nervioso de los insectos por varios autores (Kenyon 1897, Cajal y Sánchez 1915, y Strausfeld 1971).

Todos estos procedimientos constan básicamente, de una etapa de fijación bicrómica (bicrómica-aldehídica o bicrómica-osmica) y una segunda de impregnación argéntica. La variante comúnmente usada es la siguiente:

a) fijación de los tejidos en una solución de Cr O₇ K₂ al 5% a la cual se le agregan cantidades variables de formaldehído al 40%.

b) Impregnación del material en una solución de AgNO₃ al 0,75% .Las piezas permanecen en la plata de uno a tres días. Una vez impregnadas, son deshidratadas e incluídas en resina epóxica (Durcupam AMC Fluka), cuya consistencia fue adaptada a la obtención de cortes gruesos. Estos se efectuaron en un microtomo Spencer de deslizamiento a espesores variables entre 60 y 90 micras. Las secciones se depositaron ordenadamente sobre una hoja vinilica "Mylar" provisto por (Carolina Biological Suppliesco) utilizando como medio de montaje la misma resina. Luego del "curado" de la resina a 60 grados centígrados, los preparados fueron estudiados en microscopios de luz (Zeiss u Olympus) equipados con máquinas fotográficas y tubos de dibujo.

Es bien conocido que las técnicas cromo-argénticas dan resultados aleatorios. Advierte Cajal: "Es necesario tener presente, que la experiencia y perseverancia del aprendiz, contribuyen decisivamente... el principiante no debe esperar resultados brillantes... hasta no haber realizado, múltiples y cuidadosos ensayos" (Cajal y Castro 1972). Cuando se trata de los tejidos larvarios, de Apis mellifera, las buenas impregnaciones son escasas. Los datos que se presentan en este trabajo son el resultado de la impregnación de mas de cien ejemplares, en distintas etapas del desarrollo.

III- RESULTADOS

III-1 Diferenciación de los Fotorreceptores

III-1-1 Fase Larval

Como ya se ha mencionado en la introducción, los primordios de los ojos compuestos se hallan adosados al cerebro larval. Un corte coronal a través de uno de estos primordios, en la etapa prepupal, permite reconocer a la futura retina y a los grupos de células y haces de fibras que darán origen a la lamina, medulla y lobula (fig.3).

En este mismo estadio, la observación "in vivo", bajo microscopio de disección, del epitelio que dará origen a la retina, muestra un gradiente de pigmentación con un máximo en la zona dorsal. En cambio, la zona más ventral prácticamente carece de granos de pigmento. Paralelamente las células que allí yacen conservan el aspecto de células epiteliales indiferenciadas. La aparición de granulos de pigmento es un signo que facilita apreciar el grado de maduración de la retina.

La zona dorsal pigmentada, contiene agrupaciones celulares identificables como "protomatidias". En los cortes longitudinales, las futuras células fotorreceptoras se muestran como elementos más alargados que las epiteliales comunes. En algunas ocasiones se puede evidenciar la presencia de axones que nacen de sus polos proximales. El microscopio electrónico muestra claramente a las unidades

protomatidiales formadas por grupos de nueve células, una de las cuales ocupa el centro de cada unidad (fig.4) En esta etapa del desarrollo, el citoplasma de los futuros fotorreceptores contiene mitocondrias, lisosomas y cuerpos densos e irregulares que corresponden a los gránulos de pigmento observables bajo el microscopio de luz.

Es de hacer notar que entre los protofotorreceptores existen uniones "septadas" (fig.4), descritas también en otras especies de insectos, tanto en el estadio adulto como durante el desarrollo (Gehring 1973, Lane 1984). De la zona apical de cada unidad protomatidial, protruyen microvellosidades, más largas y regulares que las que se observan en las células indiferenciadas (fig.5).

Tal cual fue descrito por Sánchez y Sánchez (1916) en lepidopteros y confirmado por Trujillo y Melamed (1973) en los dípteros, los fotorreceptores de los insectos pasan durante su desarrollo, por una etapa bipolar. El uso del cromato de plata ha permitido también reconocer, esta fase en el curso de la diferenciación del ojo compuesto de Apis mellifera. Es posible identificar dos poblaciones celulares bipolares: una constituida por células cuyos somas yacen cercanos a la superficie del epitelio, y por lo tanto poseen una dendrita apical corta, y otra formada por células con el soma más alejado y con la dendrita apical larga (fig.6).

En los dípteros muscoides se pudo comprobar que las células con dendritas apicales largas son las que dan origen a los complejos celulares centrales en la omatidia 7/8. En el caso

de la abeja no se ha podido establecer con exactitud, la correspondencia que existe entre las diferentes poblaciones celulares, y los diversos tipos de fotorreceptores identificables en el adulto.

Si se desea explorar el futuro polo sináptico de los fotorreceptores, es necesario alcanzar los primordios de los centros visuales ubicados muy próximos al cerebro larval.

En la fase prepupal existe una zona primordial común en la que pueden distinguirse los grupos de neuroblastos que darán origen a las neuronas de la lamina y medulla respectivamente (fig.3).

Cabe hacer notar que en los estadios larvarios avanzados (prepupa), los axones de los futuros fotorreceptores ya han llegado al primordio de la lamina. En los cortes transversales que pasan a través de la zona mas superficial de la misma, el microscopio electrónico permite distinguir grupos ordenados de axones. A nivel más profundo, sus terminaciones en forma de masa, se intercalan con neuroblastos y con las prolongaciones de los primeros elementos neurales diferenciados. Dichas terminales inmaduras, estan provistas de filopodios y microespinas (fig.7). Con el microscopio electrónico se pudo comprobar que los filopodios y microespinas, establecen contactos entre sí y con otros procesos neuronales. Estos contactos se caracterizan por la existencia de densificaciones simétricas, tales como las descritas, en otras especies (fig.8). A medida que transcurre el desarrollo, los

filopodios comienzan a disminuir en número, hasta que prácticamente desaparecen al alcanzarse el estadio adulto. Sin embargo, algunas de las terminaciones sinápticas del adulto, exhiben un aspecto "deshilachado" (Cajal y Sánchez, 1915) que tal vez pueda corresponder a remanentes de filopodios existentes en etapas anteriores.

III-1-2 Fase Ninfal

La etapa ninfal es el período más prolongado del desarrollo de la abeja. En esta etapa desaparecen todos los tejidos larvales que son sustituidos por aquellos originados a partir de las células imaginales.

Los cortes longitudinales de la retina de ninfa, muestran el alargamiento de los fotorreceptores, la pérdida de sus dendritas apicales al igual que el alargamiento de sus axones. En algunos casos se pudo constatar la persistencia de una dendrita apical con un abultamiento esférico (fig.9). Un hecho similar fue descrito por Sánchez (1916) en las ninfas de lepidópteros. Las técnicas de microscopía electrónica permiten reconocer con claridad, la disposición de los futuros fotorreceptores. Estos se agrupan circularmente, siguiendo un modelo que se repite con regularidad en amplias zonas de la retina (fig,10). Las mismas técnicas también permiten ver, el comienzo de la diferenciación del rabadoma. En la zona central de cada omatidia, se encuentran las primeras microvellosidades rabadoméricas. Estas son irregulares en tamaño y forma, sin evidenciar aun un claro patron de ordenamiento (fig.10 inserto). A ese nivel, el citoplasma presenta mayor densidad electrónica y hay ausencia de organelos citoplasmáticos. En las membranas de las microvellosidades y en las superficies de los fotorreceptores, se pueden encontrar figuras "omega"

(fig.10), hecho que sugiere una activa síntesis o reciclaje de membrana plasmática. Tal cual ha sido descrito en la abeja adulta (Varela y Porter,1969) y en otras especies de insectos, los fotorreceptores ninfales están ya vinculados por medio de desmosomas que circundan la zona del rabdoma. En el citoplasma de estas células, se observan abundantes mitocondrias y densos gránulos de pigmentos. En la otras áreas de contacto interreceptorial, se verifica la persistencia de uniones septadas.

Entre los protofotorreceptores corren longitudinalmente, cuatro estructuras de sección ovalada que corresponden a la prolongaciones de las células que forman el cono cristalino. Se conocen con la denominación de "raíces del cono". Estas prolongaciones se presentan siempre con un diámetro mayor en la etapa ninfal que en el estado adulto (fig.10).

Las células pigmentarias de la retina forman una corona que rodea y aísla cada unidad visual (fig.11). En el curso de la fase ninfal estas células aparecen vinculadas entre sí por medio de zonas de íntima aposición de membranas, que obliteran en forma localizada el espacio extracelular (fig.11 inserto). También se ha constatado la presencia de zonas ocluyentes entre las células pigmentarias y los futuros fotorreceptores.

En la ninfa existe un considerable espacio entre la retina y la lamina, inexistente en el estado larval. En este espacio se ven, numerosos haces de axones, bañados por la hemoloinfa, la que contiene a su vez, variados tipos de

células macrofágicas. Cortes tangenciales que pasan a través de los sectores más superficiales de la lamina ninfal, muestran con claridad la existencia de grupos de nueve axones en tránsito hacia la zona sináptica. Estos axones carecen de vainas individuales, sin embargo, cada grupo está aislado por una cubierta de citoplasma glial (fig.12).

La organización estructural de la lamina exhibe ya un aspecto similar a la del adulto. Las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores se tiñen con relativa facilidad con el método de Golgi, estas son más largas que las observadas en el estadio larval y todavía poseen espinas (figs.13,14). Con el mismo método cromo-argéntico, se pueden reconocer las características morfológicas de las neuronas de segundo orden, con las cuales establecen sinapsis los fotorreceptores. Se observa también la disposición de algunas de las fibras centrífugas, aun inmaduras, que forman parte de los complejos sistemas aferentes descritos en el adulto por Cajal (1915) (figs.15,16).

III-1-3 Fase Adulta

Si bien aquí se ha estudiado fundamentalmente, el proceso de la diferenciación de las células fotorreceptoras. Este análisis crecería de un contexto adecuado, si no se incluyeran algunos datos sobre la estructura del ojo adulto. Estos sólo confirman observaciones realizadas por otros investigadores (Ribi 1975,1979 y Varela y Porter 1969). Los datos de Varela y Porter sobre la retina madura de Apis mellifera indican que los fotorreceptores tienen un largo aproximado de 350 micras y un diámetro decreciente de 21,5 micras. Estos autores dividen al soma de cada fotorreceptor en tres zonas:

- 1) Una zona pigmentaria: corresponde a la porción apical, donde se localizan gran número de gránulos de pigmento.
- 2) Una zona nuclear: caracterizada por la presencia del núcleo y donde disminuye la concentración de pigmento.
- 3) Una zona tubular: corresponde a la porción basal de la célula. Presenta menor cantidad de mitocondrias que las zonas anteriores y aparecen aquí los primeros neurotúbulos que serán abundantes a nivel del axon.

Cada omatidia contiene nueve células fotorreceptoras que siguen un modelo fijo respecto a sus disposiciones espaciales referidas a las tres coordenadas clásicas del ojo compuesto (ejes, x, y, z) (fig. 10a) (Ribi, 1979). Ocho de estas células se encuentran en toda la longitud de la retina, la

novena es muy corta y aparece sólo próxima a la membrana basal (Prrelet,1969).

La disposición espacial, la organización citológica y la estructura del rabdoma se muestran en la (fig.17).

En cada fotorreceptor las microvellosidades rabdoméricas se orientan perpendiculares al eje longitudinal de cada célula. En los cortes transversales de las omatidias, se observan las microvellosidades en dos direcciones preferenciales que se conservan a lo largo de la totalidad del rabdoma (fig.19).

Los nueve axones que nacen de los fotorreceptores, se dirigen a la lamina, atraviesan la membrana basal y sufren una torsión de 180 grados. Terminan en una misma unidad sináptica llamada "cartucho óptico" (Cajal,1915). Es importante señalar que estos cartuchos son menos evidentes que en los dípteros.

En la abeja la proyección retina-lamina es directa ya que no existe el "quiasma externo" de Cajal presente en los dípteros muscoides. En la medida que los axones contactan con los procesos laterales de las prolongaciones axónicas de las neuronas de la lamina, se establece la organización definitiva de los cartuchos ópticos. Como ya se ha señalado, los cartuchos de Apis mellifera, no son claramente visibles como unidades independientes (Trujillo,1985). Con la ayuda del microscopio electrónico, se ha detectado una distribución constante de los grupos de terminales sinápticas de los fotorreceptores, comparable a la de un mosaico hexagonal

(Ribi, 1979). Como se observa en el esquema adjunto (fig. 18b) no todos los axones tienen el mismo diámetro. Aquellos que nacen de los fotorreceptores 7, 8 y 9 son más delgados y terminan en la segunda estación sináptica o medulla (fibras visuales largas). Los seis axones restantes son de mayor diámetro y terminan en la lamina (fibras visuales cortas). Ribi estudió minuciosamente la lamina y las terminaciones de los fotorreceptores. Él afirma que es posible identificar morfológicamente, la terminación sináptica de cada fotorreceptor y correlacionarla con su correspondiente célula fotorreceptora en la retina.

IV- DISCUSION

"La diferenciación celular puede y debe ser encarada a diversos niveles, los cuales se encuentran, sin embargo totalmente integrados en la realidad biológica de cada célula" (García,1983).

Como ya se ha indicado en la introducción, este trabajo cubre fundamentalmente, algunos aspectos de la expresión morfológica de la diferenciación de las células fotorreceptoras del ojo compuesto de Apis mellifera. Se han omitido datos referentes a la maduración del aparato dioptrico y de las células pigmentarias, pero se han incluido algunos datos e imágenes relacionadas con la maduración de las neuronas y fibras centrifugas de la lamina.

La organización estructural de cada fotorreceptor, esta adaptada a la recepción y transmisión de la información contenida en la luz. En la Clase Artropoda la función receptora-trasductora del estímulo lumínico, se realiza en el rabdoma. Este esta formado por las llamadas "microvellosidades rabdoméricas" que contienen las moleculas fotosensibles y cuya superposición ordenada, constituye uno de los factores que aseguran la máxima captación y aprovechamiento energético de los fotones. Es hoy bien conocido que el rabdoma, al igual que los artículos externos

de conos y bastones en los vertebrados actúan como guía de ondas (Menzel y Snyder, 1974).

En Apis tal cual acontece en la mayoría de las especies de insectos las microvellosidades de los fotorreceptores contribuyen a la formación de un rabdoma central, único "rabdoma fusionado". No cabe duda que la diferenciación de esta estructura es uno de los eventos más importantes en el proceso de maduración de los fotorreceptores. El fenómeno comienza en el período post embrionario, más precisamente en la etapa ninfal.

Such (1975) considera, en base a investigaciones realizadas en un fásmodo (*Carausius morosus*), que las microvellosidades apicales observadas en los protofotorreceptores larvales, representan los primeros esbozos del rabdoma. Este autor deduce que los movimientos celulares que tienen lugar a partir del estadio larval, llevan a las células a invaginarse "inclinándose progresivamente". Estos movimientos celulares determinarían que las microvellosidades, primitivamente apicales, se alinearían ordenadamente a lo largo del eje longitudinal de la futura omatidia. Esta hipótesis está basada en la posición que ocupan las uniones de membranas entre los fotorreceptores adultos (longitudinales y paralelas al eje mayor de la omatidia). Según Such esto ha de considerarse una consecuencia de la lateralización de la superficie apical de cada célula. Por lo tanto las microvellosidades que en las primeras etapas eran apicales, en el adulto ocupan una

posición mesial. Las especializaciones de membranas (zónula adherens) actuarían como "marcadores celulares" que permitirían deducir los citados movimientos.

Las imágenes obtenidas en la etapa larvaria demuestran concluyentemente que los protofotorreceptores poseen microvellosidades. Sin embargo, no caben dudas que estas microvellosidades son diferentes a las que se observan en el período ninfal, en la zona de crecimiento del rabdoma. Las microvellosidades presentes en la larva, son muchos más largas y regulares que las que se ven en la etapa ninfal. Además en los dípteros el rabdoma se origina a partir del crecimiento de microvellosidades cortas e irregulares, existentes a lo largo de la superficie latero-medial de cada fotorreceptor. Sin adelantar una opinión definitiva, nuestros datos no son totalmente coincidentes con los de Such. Sería necesario emplear técnicas de marcado celular (específicas de la superficie apical) para lograr aportes definitivos sobre este punto.

Al comparar las observaciones realizadas en el estadio ninfal con las imágenes de la omatidia en el adulto, las diferencias morfológicas son significativas. En el adulto el rabdoma aparece como una estructura compacta que ocupa un volumen considerable de la unidad omatidial. Sus microvellosidades son regulares y están ordenadas siguiendo dos direcciones, perpendiculares entre sí. Según Ribí (1975) la orientación de las microvellosidades es constante a lo largo de toda la longitud celular, y no habría "torsión",

hecho importante cuando se considera al rhabdoma como "analizador" de luz polarizada.

Tal cual ha sido reiteradamente mencionado, los eventos morfológicos solo son la expresión de fenómenos más básicos que tienen lugar a nivel molecular. En estos últimos años se han hecho notables progresos referentes al conocimiento de la diferenciación de las células mediante la introducción de técnicas de biología molecular. Son destacables en este contexto, los trabajos del grupo de Benzer en *Drosophila* (Venkatesh, 1985), utilizando anticuerpos marcados con compuestos fluorescentes. Con estas técnicas se exploraron dos niveles de organización que podríamos llamar semimicro y micro. El primero permitió aportar datos sobre el ensamblado celular a nivel omatidial, y el segundo posibilitó un análisis morfológico más fino. Los datos obtenidos confirmaron que la unidad omatidial no es de origen clonal, sino que surge del reclutamiento ordenado de las células indiferenciadas. Se correlacionaron además los cambios morfológicos que experimentan las células con la aparición de determinadas especies proteicas durante el desarrollo. Respecto a la diferenciación de la porción neural del ojo, más precisamente de la lamina y la medulla, el presente trabajo sólo aporta datos generales. Se verificó que al igual de los que ocurre en Odonata (Mouze, 1974) la lamina y la medulla surgen de una masa única de neuroblastos. El análisis a nivel celular permitió comprobar que tal cual acontece en otras especies, los extremos proximales de los

protofotorreceptores, poseen numerosos filopodios que van desapareciendo "pari pasu" con la maduración del sistema nervioso. Es razonable pensar que el reconocimiento del "blanco correcto" tiene como sustrato molecular, la identificación por cada célula en crecimiento de una especie proteica común, tal vez constituyente de la membrana plasmática.

Es lícito finalizar esta discusión, exponiendo en forma de interrogantes, las incognitas que aun plantea la diferenciación de la porción neural del ojo de Apis mellifera.

1)Cuál es la guía que permite a los axones de los fotorreceptores encontrar su camino a la lamina y asegurar el establecimiento de conexiones correctas?

En los dípteros esta guía la constituye el llamado nervio de Bolwig formado por axones provenientes de un órgano fotorreceptor larvario. El disco imaginal del ojo esta intimamente unido a este nervio y cuando las células del disco se diferencian, los axones neoformados se suman a los ya existentes y entran con ellos a la lamina. (Trujillo-Cenóz, 1973).

En *Daphnia magna* las observaciones de Lopresty (1974) sugieren la existencia de un mecanismo diferente pero análogo en su esencia. Durante el desarrollo del ojo de este crustáceo, madura precozmente a partir de un fotorreceptor, una fibra nerviosa que de alguna manera sirve de guía al resto de los axones. Lo que aun no queda claro, es el

mecanismo por el cual esta fibra pionera encuentra su camino.

En Apis no se ha encontrado un nervio similar al de Bolwig ni se ha podido comprobar la maduración precoz de una fibra fotorreceptora.

2) Cuál es la funcionalidad de los filopodios?

Es probable que la función de los filopodios y microespinas, sea la de permitir el movimiento de las terminaciones de los axones y facilitar la realización de contactos intercelulares transitorios.

El microscopio electrónico muestra a nivel de los neuropilos inmaduros, especializaciones simétricas de las membranas, particularmente a nivel de los extremos de los filopodios. Es posible que representen puntos de intercambio de información que guían a la célula a su destino definitivo. Los experimentos de Bastiani (1985) de transplante de sistema nervioso central en embriones de *Drosophila*, demuestran la selectiva afinidad molecular, que presentan los filopodios de los conos de crecimiento. Estos serían capaces de reconocer neuronas y zonas específicas de sus prolongaciones.

Se ha de señalar por último que el ojo compuesto de los insectos no es ni estructural ni funcionalmente homogéneo. Existen zonas de diferente acuidad visual y con distintas sensibilizaciones espectrales. No hay duda que estas heterogeneidades surgen durante el desarrollo. Sin embargo, es poco lo que se ha podido adelantar en este campo. Solo se

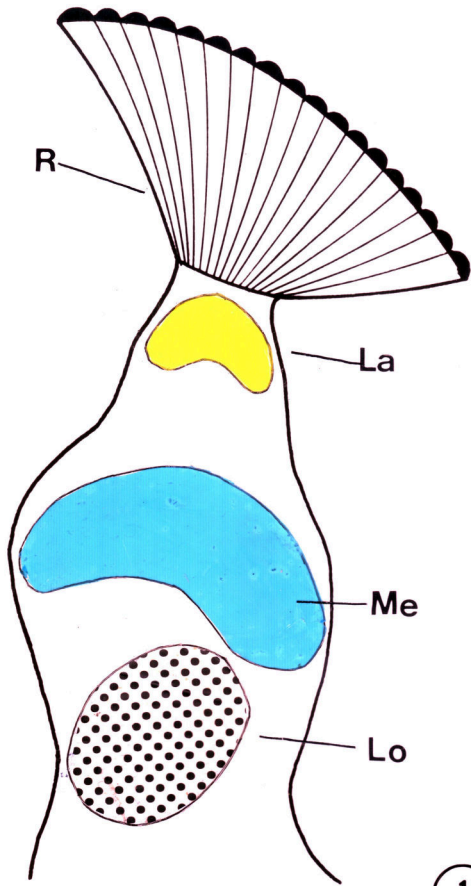
mencionara un dato fragmentario aun, obtenido durante la realización de este trabajo. En la etapa ninfal cada omatidia aparece como "enclaustrada" por una corona de citoplasma proveniente de células pigmentarias. Estos procesos citoplasmicos estan vinculados entre sí y con los fotorreceptores por uniones ocluyentes. Esta peculiar organización sugiere que concluído el reclutamiento celular, y fijada ya la ubicación espacial de cada fotorreceptor en la unidad omatidial, se obliteran las posibilidades de comunicación humoral entre células de omatidias diferentes. Es obvio que con tecnicas puramente morfológicas, no es posible aclarar los problemas fundamentales, que todavía se mantienen respecto a la diferenciación del ojo compuesto y del sistema nervioso central. También es cierto sin embargo, que una correcta descripción morfológica, constituye una base fundamental e imprescindible para la realización de estudios futuros con otras técnicas.

AGRADECIMIENTOS

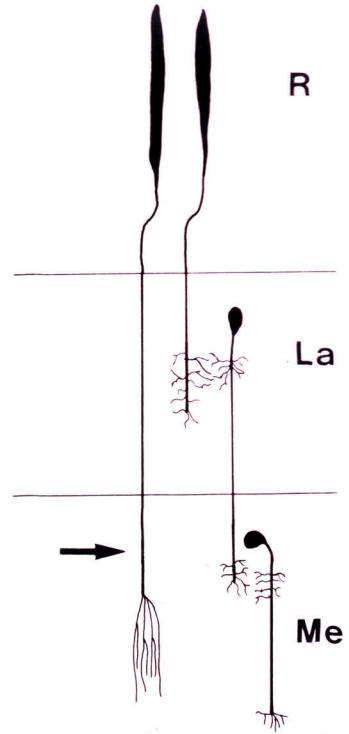
Deseo agradecer a la División Neuroanatomía Comparada del Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable", por haberme brindado la posibilidad de trabajar en dicho laboratorio para llevar a cabo el presente trabajo.

Agradezco en especial al Jefe de la mencionada División Dr. Omar Trujillo-Cenóz, quien me ha dirigido durante el desarrollo del mismo, tanto en la enseñanza del manejo de las técnicas utilizadas, como en la corrección del manuscrito.

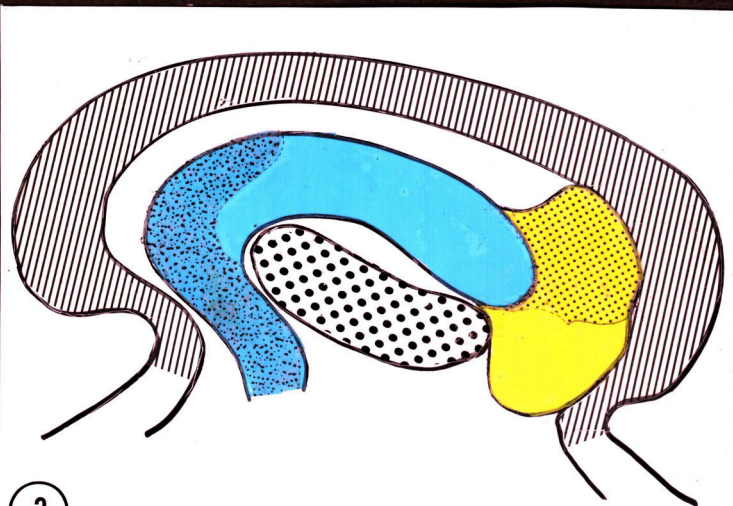
Debo expresar por último mi reconocimiento a Ana Cardona y María del Carmen Urtasun por haberme enseñado el manejo de las colmenas y colaborado en la colecta del material.



1



2



3



V- FIGURAS Y LEYENDAS

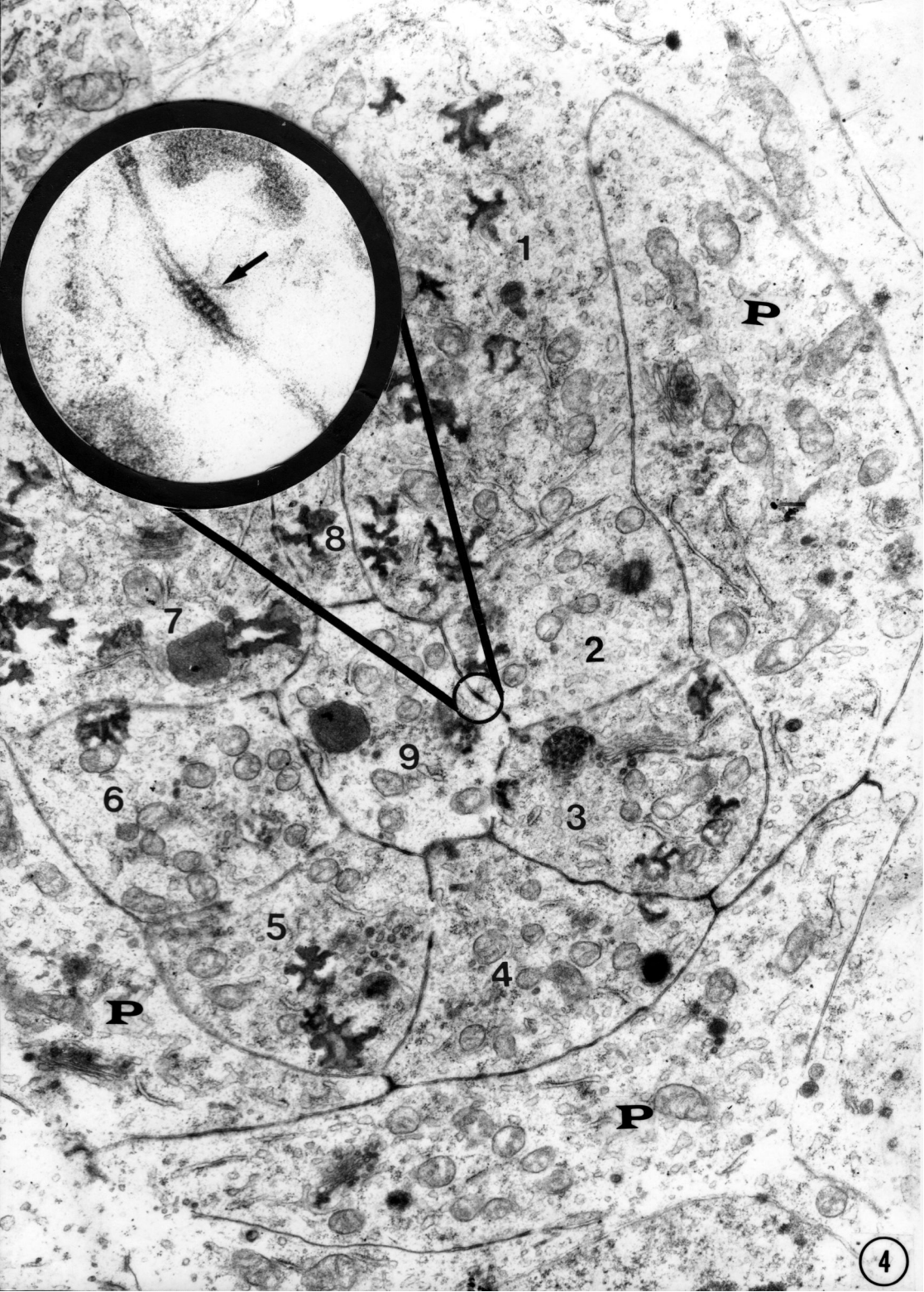
Figura 1.- Representación esquemática de un corte coronal del ojo de la abeja adulta. Se muestra la retina (R) y la disposición de las tres principales estaciones sinápticas: (La) lamina, (Me) medulla y (Lo) lobula.

Figura 2.- Esquema representativo de los circuitos neurales básicos involucrados en el procesamiento de la información en el seno de las dos principales estaciones sinápticas. Se muestran los dos tipos de fibras nerviosas originadas de los fotorreceptores retinianos: a) "fibras visuales cortas" que establecen sinápsis con los diversos tipos de neuronas de la lamina y b) "fibras visuales largas" (flecha) que terminan en la medulla.

Se muestra también en forma simplificada, la articulación sináptica de una neurona monopolar de la lamina con la segunda neurona de la vía óptica ubicada en la medulla. La señalización es la misma que la usada en la figura 1.

Figura 3.- Diagrama que representa un corte histológico coronal a través del primordio del ojo compuesto de Apis (larva prepupal). Este esquema permite reconocer la ubicación de la futura retina y de los primordios neurales con sus respectivos acúmulos de neuroblastos (tramas sobre fondo coloreado) (La) lamina (NL) neuroblastos de lamina (Me) medulla (Nm) neuroblastos de medulla (Lo) lobula. A la derecha del diagrama se encuentra la clave de colores, tramas y letras que permiten identificar las distintas estructuras del ojo.

Figura 4.- Corte ligeramente oblicuo respecto al eje principal de una protomatidia larval. Se observan nueve protofotorreceptores (1-9), uno de los cuales (9) ocupa la posición central. A nivel de las superficies de contacto inter-receptoriales se pueden encontrar especializaciones de membrana con las características de las llamadas "uniones septada" (circulo pequeño en la micrografía panorámica en inserto a mayor magnificación). En el citoplasma de los protofotorreceptores se observan numerosas mitocondrias, gránulos irregulares de pigmento y lisosomas. (P) futuras células pigmentarias. 28.800 X (inserto) 72.400 X.



1

P

8

7

2

6

9

3

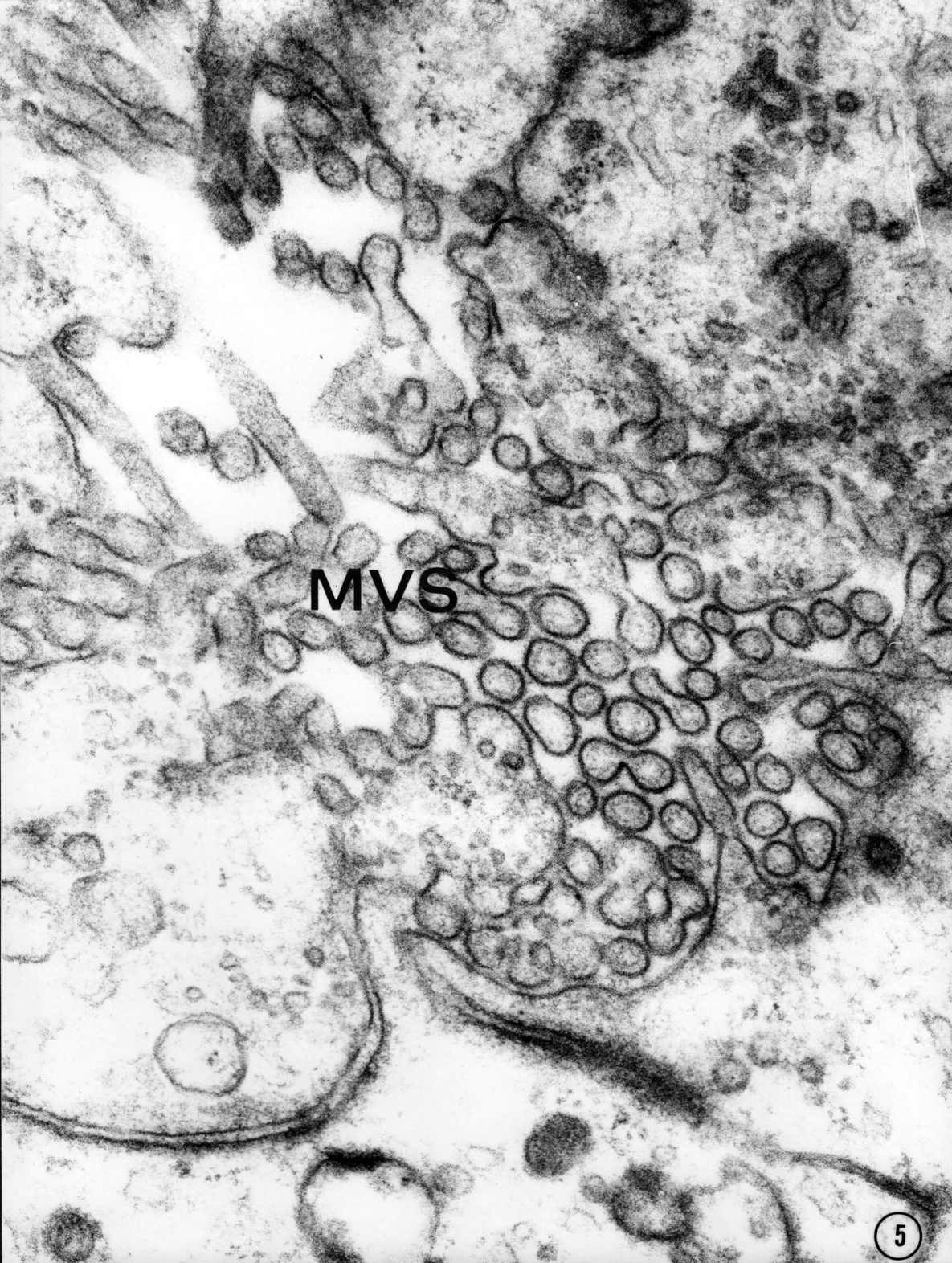
5

4

P

P

Figura 5.- Esta micrografía electrónica muestra cortes transversales y longitudinales de numerosas microvellosidades (MVS). Estas nacen de las superficies apicales de los protofotorreceptores larvales y se proyectan desde la superficie de la futura retina hacia el espacio extracelular. 70.000 X.



MVS

Figura 6.- Micrografía de protofotorreceptores larvales en fase bipolar teñidos por medio del cromato de plata. Se constata la existencia de dos tipos de protofotorreceptores: a- con dendrita apical corta y el soma cercano a la superficie del epitelio y b- con dendrita apical larga y el soma más alejado. Aprox. 2.800 X.

Figura 7.- Impregnación argéntica (cromato de plata) de las terminaciones de los axones provenientes de los protofotorreceptores larvales. En este estadio ya forman una empalizada regular en el seno del primordio de la lamina. Exhiben forma de masa (flecha) y están provistos de numerosos filopodios y microespinas. Aprox. 1.000 X.

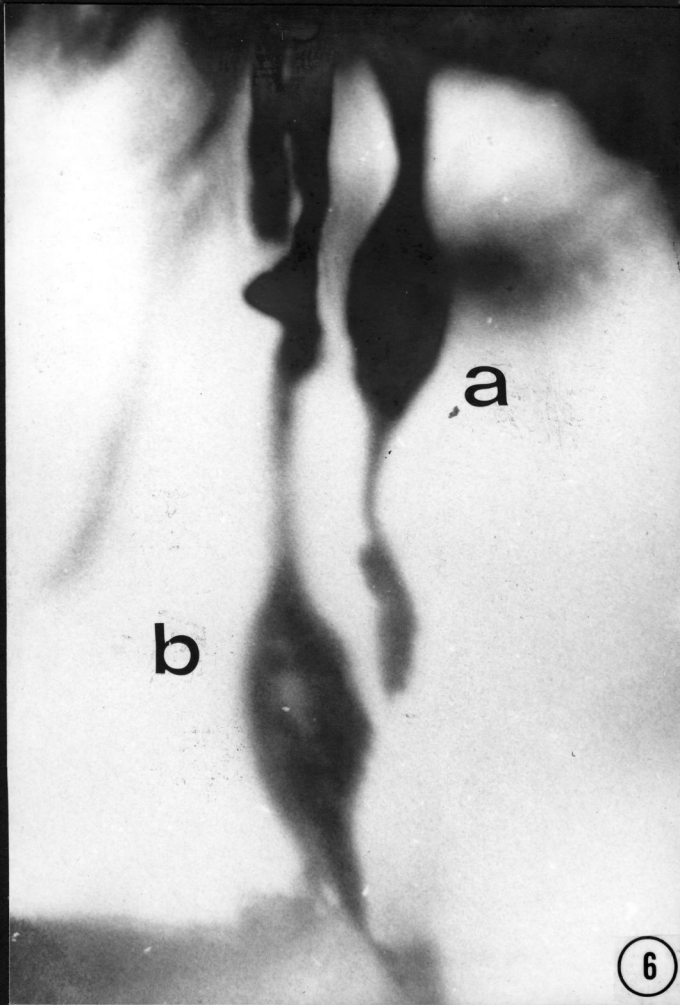


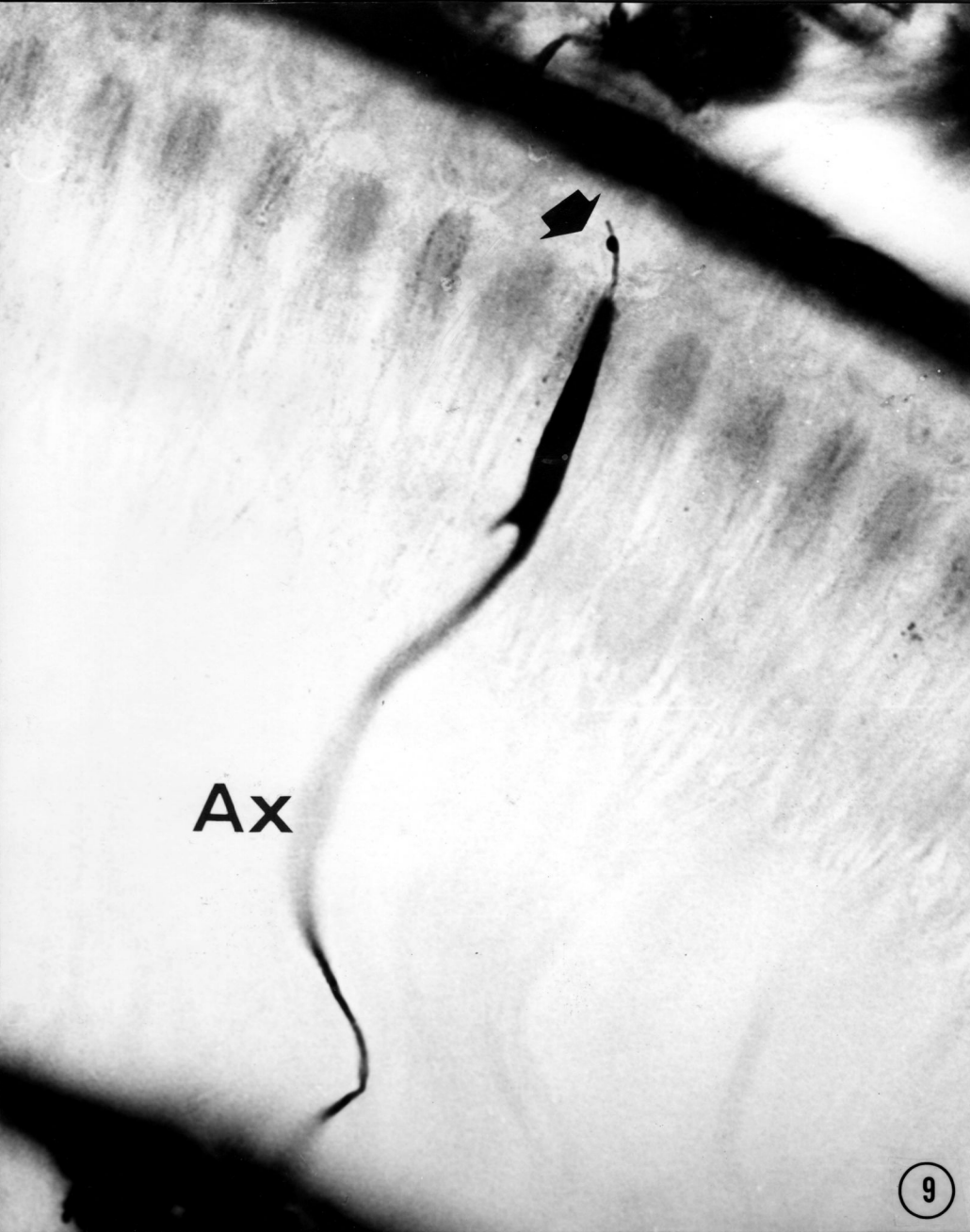
Figura 8. - Micrografía electrónica de un corte a través de la futura zona sináptica, en el primordio de la lamina. (estadio prepupal). Los filopodios que cubren a las terminaciones de los protofotorreceptores establecen entre sí, y con las prolongaciones de las futuras neuronas de segundo orden, numerosos contactos. Las membranas plasmáticas muestran en esos puntos de contacto, densificaciones simétricas (flecha e inserto). Las estructuras de aspecto típicamente sináptico son escasas. El asterisco indica una zona de contacto intercelular en la cual se observa un esbozo de densificaciones presinápticas. En esta micrografía se ponen en evidencia las dificultades que se enfrentan al intentar fijar adecuadamente el tejido nervioso larvario. En numerosas zonas se observan discontinuidades o rupturas de las membranas plasmáticas. 43.700 X (inserto) 131.000 X.



Fi

Fi

Figura 9.- En esta microfotografía se destaca un fotorreceptor inmaduro ubicado en la retina de una ninfa de Apis. En esta etapa del desarrollo no se ha modelado la morfología final de los elementos retinianos. Se observa además del axon (Ax) dirigiéndose a la lamina, el remanente de una dendrita apical larvaria con un abultamiento en el extremo. (Impregnación con el método de Golgi). Apox. 1.800 X.

A black and white micrograph showing a biological specimen. A dark, elongated, and somewhat curved structure is visible against a lighter, textured background. A small black arrow points to a specific point on the upper part of this structure. The label 'Ax' is printed in the lower-left area of the image.

Ax

Figura 10. - Corte transversal de una omatidia ninfal en que muestra la disposición espacial, en forma circular, de ocho fotorreceptores (1-8). La novena célula no es visible ya que esta ubicada a un nivel más profundo cercano a la membrana basal. En la zona central de la omatidia, se ven imágenes que corresponden al proceso de diferenciación del rabdoma. Las microvellosidades rabdómicas inmaduras (MVS) son irregulares y no están ordenadas. Se pueden ver uniones desmosómicas (asteriscos) y es común en este estadio, encontrar figuras "omega" (flecha e inserto a mayor aumento). Las prolongaciones de las células del cono cristalino (Cc 1-4) exhiben en esta etapa un diámetro mayor que en el adulto. 17.300 X (inserto) 51.800 X.

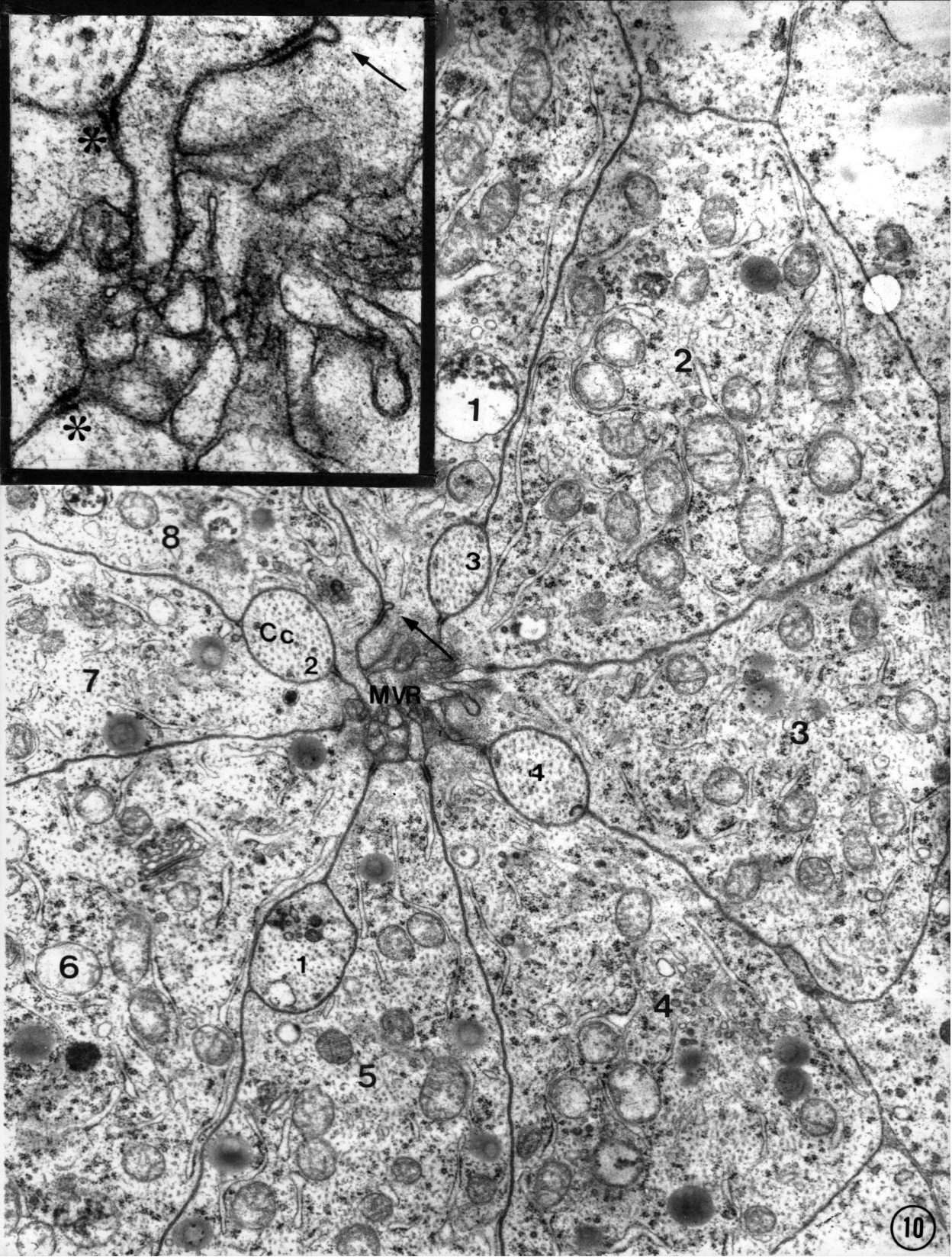


Figura 11.- Corte transversal de una omatidia ninfal, en que se ven las nueve células fotorreceptoras (1-9) y la corona de células pigmentarias, que rodean cada unidad omatidial. Estas células pigmentarias se vinculan entre sí y con los protofotorreceptores por zonas de íntima aposición de membranas. Estas uniones obliteran el espacio extracelular (flechas en micrografía panorámica e inserto) (Cc 1-4) prolongaciones del cono cristalino. 14.000 X (inserto) 145.000 X.

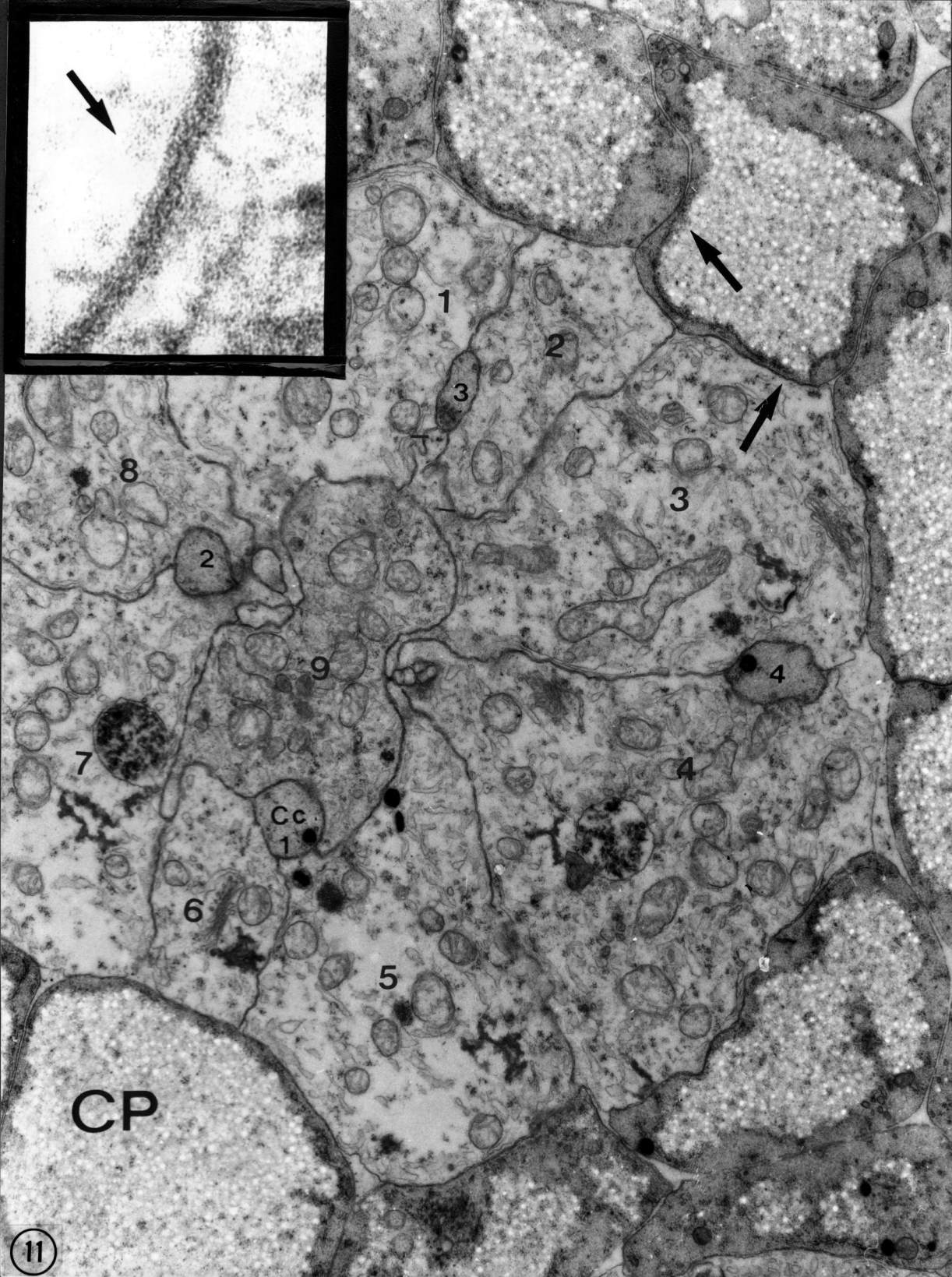


Figura 12.- Corte tangencial a través de la zona más superficial de la lamina (estadio ninfal). Esta región está caracterizada por la presencia de numerosas unidades formadas por la agrupación de nueve axones (1-9) provenientes de las protomatidias retinianas. Estos axones carecen de vainas individuales, pero cada unidad está cubierta por gruesas prolongaciones gliales (asteriscos) (Cg) célula glial. 19.200 X.

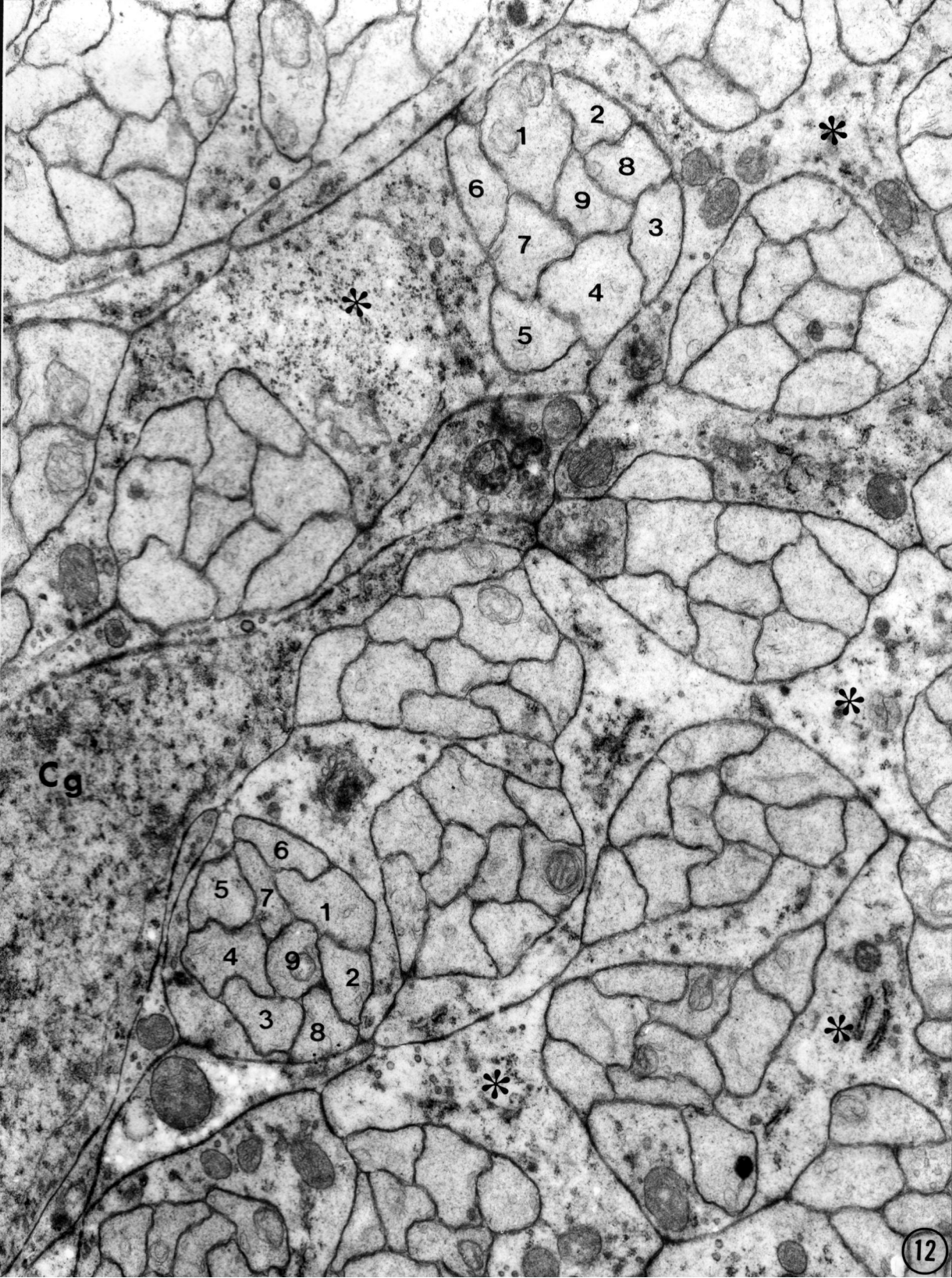


Figura 13.- En esta micrografía obtenida de un preparado teñido con el método de Golgi, se observan dos haces de axones (asteriscos) provenientes del primordio de la retina. También se ven terminaciones (flechas) en la zona del futuro neuropilo sináptico de la lamina. En este estadio (ninfa) las terminaciones de los protofotorreceptores son más largas que en la larva, pero conservan aun algunas microespinas. Aprox. 800 X.

Figura 14.- En etapas posteriores, las terminaciones se alargan mas y pierden todos sus filopodios. Se conservan sin embargo, microespinas que confieren a las terminaciones un contorno irregular. Impregnación con el método de Golgi. Aprox. 1.000 X.

13



Figura 15.- En el período ninfal ya se reconocen algunos de los tipos de neuronas de segundo orden que caracterizan a la lamina del adulto. La flecha señala el soma de una "monopolar gigante". Completamente teñida por el cromato de plata. El asterisco indica a uno de los componentes neurales que integran los sistemas de las llamadas "fibras centrífugas". Aprox. 1.000 X.

Figura 16.- En este mismo estadio se puede constatar que los segmentos terminales de algunas de estas fibras centrífugas, están cubiertas por microespinas y filopodios (flecha) (tinción con cromato de plata). Aprox. 1.800 X.

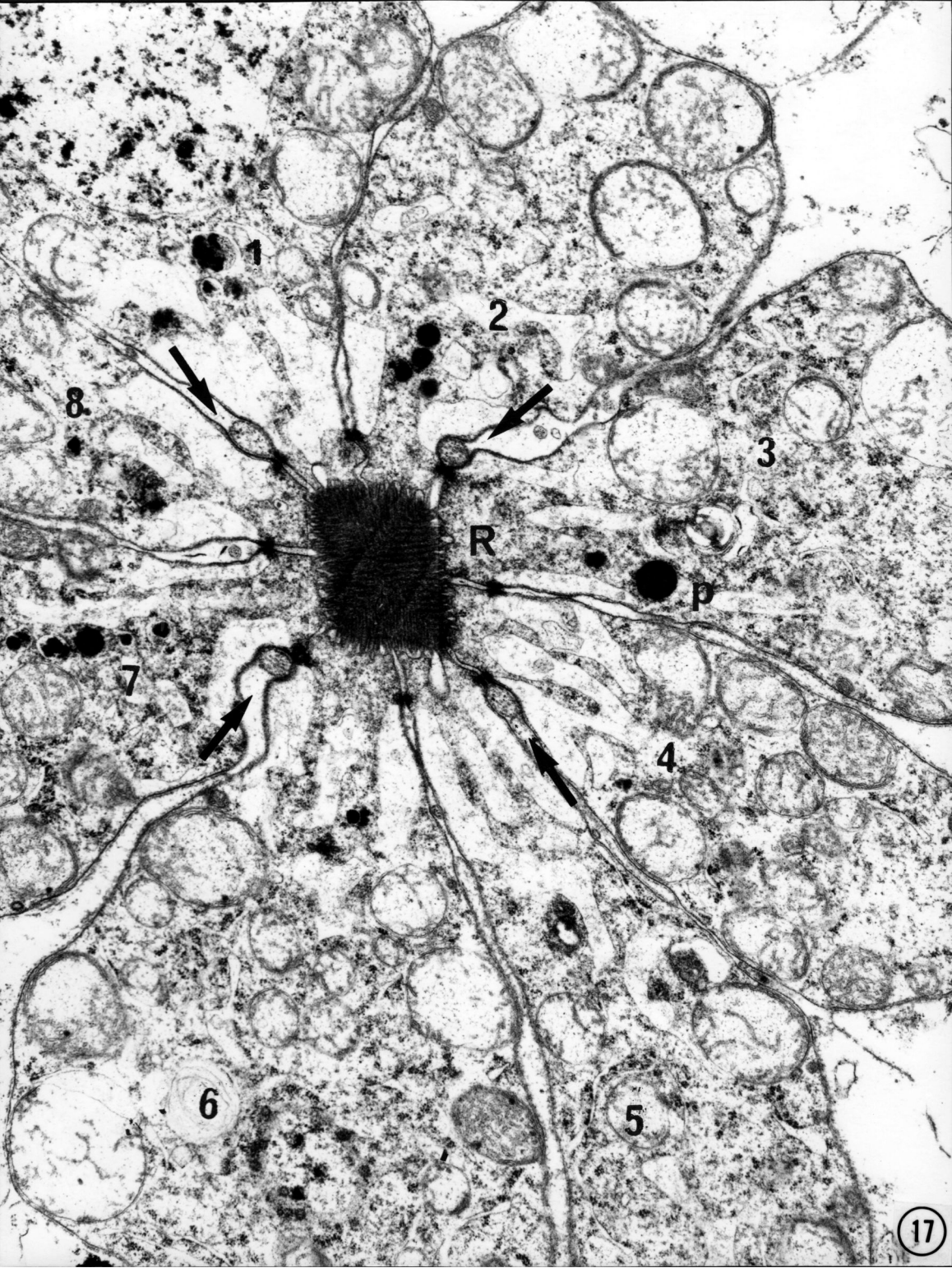
15



16



Figura 17.- Corte transversal de la omatidia en un individuo adulto en el que se observa la disposición de las células fotorreceptoras (1-8). El rabadoma (R) aparece como una estructura compacta de alta densidad electrónica. Las flechas indican las prolongaciones emanadas del cono cristalino. Los fotorreceptores contienen abundantes gránulos de pigmento (P) que son más numerosos en las zonas más apicales de las células. 17.000 X.



1

2

3

R

p

4

7

6

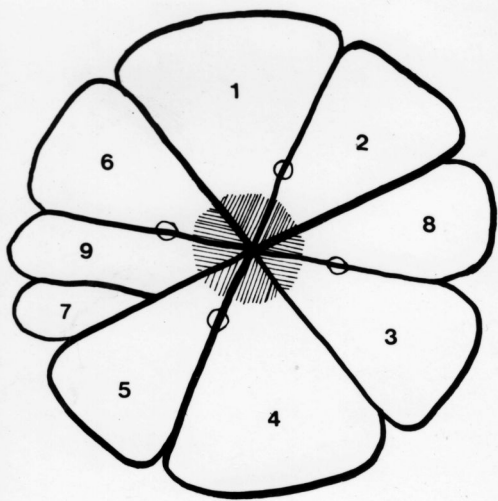
5

Figura 18.- Esquemmatización de una omatidia y de sus terminaciones axónicas en la lamina de la abeja. (Basada en un dibujo del trabajo de Ribí (1979).

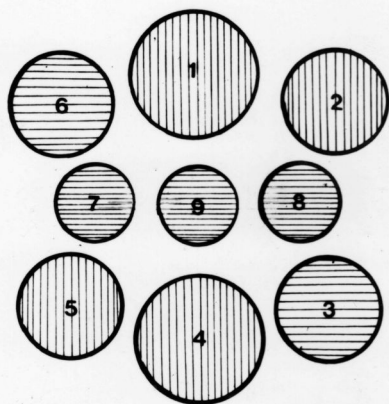
a- Corte transversal de una omatidia en que muestra la ubicación de las células fotorreceptoras (1-9) referidas a la disposición de las terminaciones sinápticas en la lamina. Se puede observar la contribución de los distintos fotorreceptores en la formación del rabdoma.

b- Corte transversal a nivel de la lamina. Los axones que corresponden a una omatidia, se distribuyen regularmente y ocupan posiciones fijas en cada unidad. Nótese la diferencia de los diámetros de aquellos que nacen de las células 7, 8 y 9 (axones finos) y se disponen en el centro. Estos axones corresponden a las llamadas "fibras visuales largas" que terminan en la medulla.

Figura 19.- Micrografía de un rabdoma maduro en el que se puede constatar su estructura "paracristalina". Las microvellosidades rabdoméricas se orientan en dos direcciones perpendiculares entre sí. Las células se han numerado de acuerdo al esquema anterior; sin embargo, no es posible asegurar la estricta correspondencia entre el esquema de Ribí y esta micrografía. 19.000 X.

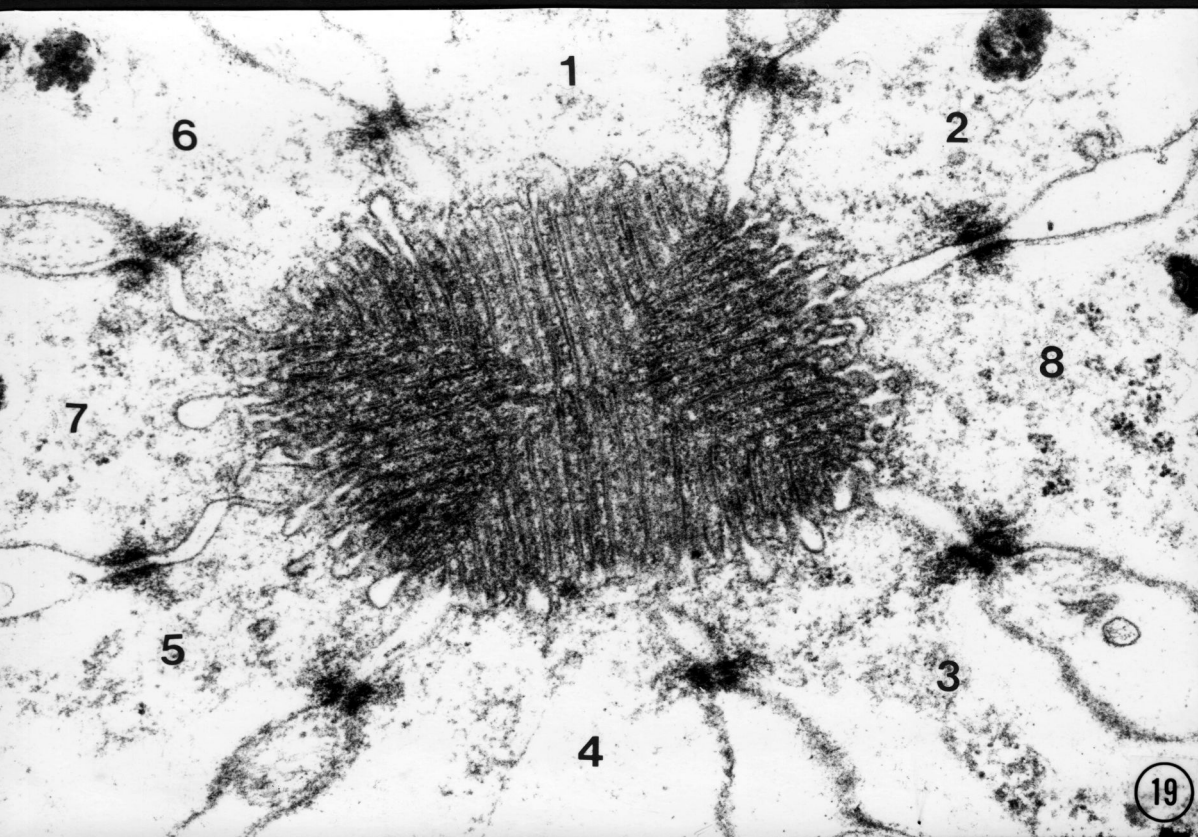


a



b

18



19

BIBLIOGRAFIA

BASTIANI, M.J., DOE, C.O., HELFAND, S.L. y GOODMAN, C.S. (1985) Neuronal specificity and growth cone guidance in grasshopper and *Drosophila* embryos. TINS.

BULLOCK, T.H. y HORRIDGE, G.A. (1965) Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates: Freeman, San Francisco.

CAJAL, S.R. (1909) Nota sobre la estructura de la retina de la mosca. Trab. Lab. Invest, Biol. Univ. Madrid 7, 217-257.

CAJAL, S.R. (1915) Contribución al conocimiento de los centros nerviosos de los insectos. Trab. Lab. Invest, Biol. Madrid. 13, 1-164.

CAJAL, S.R. Y DE CASTRO, F. (1972) Elementos de Técnica Micrográfica del Sistema Nervioso. Edit. Salvat, S.A. Mallorca, 43 Barcelona.

GARCIA, R. y PEREYRA ALFONSO, S. (1983) Qué es la diferenciación celular?. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Edit. E.V. Chesuan, Washigton DC.

GEHRING, W. y NOTHIGER, R. (1973) The Imaginal Disc of *Drosophila*. En: Developmental Systems: Insects Vol 2. Edts. Conce, S.J . y Waddington, C.H. Academic Press London.

KENYON, F.C. (1987) The optics lobes of the bee's brain in the light of recent Neurological Methodos. Amer. Nat. 31, 365-376.

LANE, N.J. (1984). Acomparision of the construction of intercellular junctions in the CNS of vertebrates and invertebrates. TINS, March.

LANGER, H. y THORELL, b. (1966) Microspectro photometric assuy of visual pigments in single rhabdomeres of the insect eye. En: Functional Organization. Edit. by Bernhard. Pp 145-149. Pergamon, London.

LOPRESTI, V., MACAGNO, E.R. y LEVINTHAL. (1974) Structura and Development of Neural Conections in Isogenic Organisms Transient Gap Junctions betwen Growing Optic Axon and Lamina Neuroblasts. Proc. Nat. Acad.,Sci. USA, Vol 71 No.4 pp 1098-1102.

MEINERTZHAGEN, J.A. (1973) Development of the compound eye and optics lobes of insects. En: Developmental Neurobiology of Arthropods. Ed. by D.Young pp 51-104. Cambridge University Press, London.

MELAMED, J. y Trujillo-Cenóz, O. (1975) The Fine Structure of the Eye Imaginal Disks in Muscoid Flies. Journal of Ultrastructure Research 51, 79-93.

- MENZEL, R. y SNYDER, A.W (1974) Polarised Light Detection in the Bee, *Apis mellifera*. *J. Comp.Physiol.* 88, 247-270.
- MOUZE, M. (1974) Interactions de l'oeil et du lobe optique de la croissance post embryonnaire des Insectes odonates. *J. Embryol. Exp. Morph.* 31, 377-407.
- MYSER, C.W. (1954) The Larval and Pupal Development of the Honey Bee *Apis mellifera*.L. *Annals Entomological Society of America* Vol. 47, pp 683-711.
- PERRELET, A. y BOUMAN (1969) Presence of three small retinula cells in the ommatidium of the honey-beedronne eye. *J. Microscopie.* 8, 497-502.
- READY, D.F., HANSON, T. y BENZER, S. (1976) Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Devel. Biol.* 53, 217-240.
- RIBI, W.A. (1975) The Neurons of the First Optic Ganglion of the Bee *Apis mellifera*. *Advances in Anatomy* 002 Fasc. 4 pag. 1-43.
- RIBI, W.A. (1979) The First Optic Ganglion of the Bee. III Regional Comparison of the Morphology of Photoreceptor-Cell Axons. *Cell Tiss, Res.* 200, 345-357.
- SANCHEZ, D. (1916) Datos para el Conocimiento Histogénico de los Centros Ópticos de los Insectos. Evolución de algunos elementos retinianos de *Pieris brassicae* L. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid* 14, 189-231.

SJOSTRAND, F.S. (1967) *Electron Microscopy of Cells and Tissues*. Vol. I (Instrumentation and Techniques) Academic Press New York. London.

SNODGRASS, R.E. (1956) *Anatomy of the Honey Bee*. Comstock Publishing Associates. New York.

STRAUSFELD, N.J. (1971) The organization of the insect the visual system. (Light Microscopy). Projections and Arrangements of Neurons in the Lamina Ganglionaris of Diptera. *Zellforsch.* 121, 377-441.

SUCH, J. (1975) Analyse ultrastructurale de la morphogenese ommatidienne au cours du developpement embryonnaire the l'oeil compose, chez le Phasme *Carausius morosus*. *Br. C. R. Acad. Sci., Paris, Serie D.* 281, 67-70.

TRUJILLO-CENOZ, O. y MELAMED, J. (1973) The development of retina-lamina complex in muscoid flies. *J. Ultrastruct. Res.* 42, 554-581.

TRUJILLO-CENOZ, O. (1982) Mophogenesis of Photorreceptor Cells. En: *Visual Cells in Evolution*. Edit. by J.A. Westfall, Raven Press.

TRUJILLO-CENOZ, O. (1985) The Eye: Development, Structure and Neural Connections. En: *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 6. Edits. GERAL A. Kerkut and Lawrence I Gilbert, Pergamon Press.

VARELA, F.C. y PORTER, K.R. (1969) Fine Structure of the Visual System of the Honey bee (*Apis mellifera*). I. The Retina. *J. Ultrastruct. Res.* 29, 236-259.

VENKAYESH, T.R., ZIPURSKY, S.L. y BENZER, S. (1985) Molecular analysis of the compound eye in *Drosophila*. *TINS*. Vol. 8, No. 6, 251-257.