



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPUS MONTECILLO
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**“MORFOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA
DE HEMOCITOS DE *Dactylopius coccus* Costa”
(HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE)**

SANDRA CASELÍN CASTRO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2007

La presente tesis, titulada: **Morfología y ultraestructura de hemocitos de *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae)**, realizada por la alumna: **Sandra Caselín Castro**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA _____

DRA. CELINA LLANDERAL CÁZARES

ASESOR _____

DR. SANTIAGO DE JESÚS MÉNDEZ GALLEGOS

ASESOR _____

DR. FIDEL DE LA CRUZ HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ

ASESOR _____

DR. MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

ASESOR _____

DR. TULIO MÉNDEZ MONTIEL

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados especialmente a la Orientación en Entomología y Acarología por la oportunidad de superarme profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por el apoyo económico otorgado durante mi formación académica.

Mi más sincero agradecimiento para Dra. Celina Llanderal Cázares por su confianza incondicional, asesoría y valiosas sugerencias durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

M.C. Arturo Ramírez Cruz por su apoyo y dirección, sin los cuales no habría sido posible realizar este trabajo.

A la Biol. Ma. Esther Sánchez Espíndola por el apoyo y facilidades brindadas para la realización de esta investigación y por su amistad

A los integrantes de mi Consejo Académico: Dr. Jesús Méndez Gallegos, Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández, Dr. Tulio Méndez Montiel, Dr. Marcos Soto Hernández, por su participación en la revisión del presente trabajo de investigación.

Con gran respeto y estimación a mis sinodales Dr. José Luis Carrillo Sánchez y Dr. Hiram Bravo Mojica.

Con profundo aprecio al M.C. Bartolomé Cruz Galindo quien durante mi estancia siempre me motivo y me brindo su aprecio.

A la invaluable amistad del M.C. Ramón Nieto Hernández y del Sr. Mario Lozano, que hicieron mi estancia agradable y sus palabras siempre fueron de fortaleza.

A las voces de animo y motivación del Dr. Gabriel Otero Colina, M.C. Araceli Gaytan y Dr. Héctor Gonzáles Hernández.

A todas las personas que me apoyaron para la culminación de esta investigación.

De manera especial a mis maestros que me brindaron "Su enseñanza"

GRACIAS...

DEDICATORIA

Con inmenso amor a mi pequeño hijo:

Diego Rafael

A mi madre:

Emma Castro Onofre

Por su enorme cariño y fortaleza en los momentos difíciles

En recuerdo:

De mi hermana Francisca y

De mi padre: Diego Caselín Pelcastre

porque siempre me acompañan

Con cariño a mis hermanos:

Angel, Pedro, Emma, Silvia, Lidia, Donato, Guillermo y Cecilia

A mis sobrinos...

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	iii
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Generalidades de <i>Dactylopius coccus</i>	3
2.2. Ciclo biológico de <i>D. coccus</i>	3
2.3. Características del ácido carmínico	4
2.4. Papel biológico del ácido carmínico	4
2.5. Sistema inmunológico en insectos	5
2.6. Principales tipos de hemocitos	7
2.7. Funciones de los hemocitos	8
2.8. Técnicas citoquímicas	8
2.9. Técnicas microscópicas	9
2.9.1. Microscopía de luz (Método Panóptico de Pappenheim)	10
2.9.2. Microscopía de contraste de fases	10
2.9.3. Microscopía electrónica de transmisión	11
3. MATERIALES Y METODOS	12
3.1. Material biológico	12
3.2. Caracterización citoquímica	12
3.2.1. Detección de polisacáridos (Técnica de PAS)	12
3.2.2. Lípidos (Sudán Negro B)	13
3.3. Técnicas microscópicas	14
3.3.1. Microscopía de luz (Método Panóptico de Pappenheim)	14
3.3.2. Microscopía de contraste de fases	15
3.3.3. Microscopía electrónica de transmisión	15

3.4. Variación cuantitativa de los tipos de hemocitos en los diferentes días de vida adulta de <i>D. coccus</i> .	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Morfología de los hemocitos de <i>D. coccus</i>	17
4.1.1. Microscopía de luz (Método Panóptico de Pappenheim)	17
4.1.2. Microscopía de contraste de fases (MCF)	23
4.1.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	29
4.2. Características citoquímicas de <i>D. coccus</i>	42
4.3. Variación cuantitativa de los tipos de hemocitos en los diferentes días de vida adulta de <i>D. coccus</i> .	46
4.4. Población de granulocitos suspendidos en la hemolinfa de <i>D. coccus</i> durante el estado adulto de la hembra.	47
5. DISCUSIÓN	52
6. CONCLUSIONES	57
7. BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro		Pág.
1	Tamaño de los granulocitos encontrados en hembras de <i>D. coccus</i> .	17
2	Tamaño de los plasmaticos encontrados en hembras de <i>D. coccus</i> .	19
3	Tamaño de los prohemocitos encontrados en hembras de <i>D. coccus</i> .	21
4	Cuenta diferencial de los hemocitos de hembras de <i>D. coccus</i> .	46
5	Porcentaje de granulocitos en hembras de <i>D. coccus</i> .	47
6	Análisis morfométrico de la población de granulocitos en la hembra adulta de <i>D. coccus</i> .	48
7	Promedios del área celular de la población de granulocitos de <i>D. coccus</i> .	48
Figura		Pág.
1	Granulocitos de <i>D. coccus</i> teñidos con Giemsa y May Grünwald, nótese el citoplasma con gránulos principalmente acidófilos y núcleo basófilo (100x). A granulocito pequeño, encontrado en hembras de un día de vida adulta. B granulocito oval grande, con núcleo esférico. C y D granulocitos con núcleo lobulado. E dos granulocitos esféricos, con núcleo excéntrico. F granulocito con el núcleo formando paquetes de cromatina. Los hemocitos en las figuras B , C , D , E y F corresponden a hembras de 50 días de vida adulta (50 d).	18
2	Plasmaticos de <i>D. coccus</i> teñidos con Giemsa y May Grünwald, nótese el citoplasma con características basófilas y núcleo acidófilo (100x). A plasmatico de forma oval, con núcleo central (1 d). B plasmatico esférico, con núcleo excéntrico (50 d). C , D , E y F plasmaticos fusiformes (1 d).	20
3	Prohemocitos (→) de <i>D. coccus</i> teñidos con Giemsa y May Grünwald nótese el citoplasma basófilo y núcleo acidófilo (100x). A , B y C prohemocitos, nótese que el núcleo ocupa gran parte del citoplasma (1 d). D , E y F prohemocitos con núcleo excéntrico o central, adviértase el tamaño en comparación con los granulocitos y plasmaticos ubicados a la derecha (50 d).	22

- 4 Granulocitos de *D. coccus* caracterizados con microscopía de contraste de fases (100x). **A** y **B** granulocitos de forma oval, con núcleo central y esférico (30 d). **C** granulocito esférico, con núcleo excéntrico y parcialmente lobulado (30 d). **D** granulocito pequeño con núcleo central (20 d). **E** granulocito grande alargado, con núcleo lobulado con gránulos de distinto tamaño en el citoplasma, concentrados en la periferia de la membrana citoplasmática (50 d). **F** y **G** granulocitos esféricos mostrando el núcleo lobulado, (50 d). **H** granulocito en el que se observa la cromatina en grandes paquetes. 24
- 5 Plasmacitos (→) de *D. coccus* caracterizados con microscopía de contraste de fases (100x). **A** y **B** plasmacitos ovals típicos (20 d). **C** plasmacito pequeño esférico con núcleo excéntrico (20 d). **D** plasmacitos en los que se nota la cromatina en el núcleo y son evidentes las vesículas en el citoplasma (30 d). **E** plasmacito esférico con núcleo central (40 d). **F** plasmacito binucleado (40 d). 25
- 6 Prohemocito (→) de *D. coccus* caracterizado con microscopía de contraste de fases (100x), a la izquierda un granulocito y abajo un plasmacito (30 d). 26
- 7 Oenocitoide de *D. coccus* caracterizado con microscopía de contraste de fases (100x), nótese la presencia de un cristal. 27
- 8 Vista de una muestra de hemolinfa de *D. coccus* con microscopía de contraste de fases (100x). **A** corpúsculos de ácido carmínico alrededor de un hemocito y a la derecha un plasmacito. **B** conglomerado de corpúsculos de ácido carmínico alrededor de dos granulocitos. 28
- 9 Granulocito de *D. coccus* caracterizado con microscopía electrónica de transmisión (15 d). Célula oval con núcleo (N) excéntrico y lobulado, con nucléolo (NU), presencia en el citoplasma de mitocondrias (M) de forma y tamaño variable (x75000). 30

- 10 Ultraestructura de un granulocito de *D. coccus* (15 d). **A** granulocito con núcleo (N) excéntrico (x10000). **B** ampliación del mismo granulocito, nótese la presencia de mitocondrias (M) de tamaño variable, retículo endoplasmático rugoso (RER) y vesículas (VE) (x25000). **C** aumento de otra zona del mismo granulocito, nótese en el citoplasma RER y ribosomas (R) dispersos. La cromatina (CM) se concentra en la periferia de la membrana nuclear (MN) (x50000). 31
- 11 Ultraestructura de un granulocito de *D. coccus* (15 d). **A** granulocito oval, con núcleo central (x10000). **B**. Aumento del mismo granulocito, nótese la presencia de mitocondrias (M), retículo endoplasmático rugoso (RER), ribosomas (R) dispersos y vesículas (VE) (x25000). 32
- 12 Ultraestructura de granulocitos de *D. coccus* (15 d). **A**, **B** y **C** granulocitos con organelos en el citoplasma y núcleo lobulado (x10000). **D** granulocito con núcleo lobulado (x7500). Nótese que la cromatina se concentra en la periferia de la membrana nuclear 33
- 13 Ultraestructura de plasmátocitos de *D. coccus* (15 d). **A** plasmátocitos de forma irregular con núcleo (N) multilobulado (x5000). **B** y **C** ampliación para observar la irregularidad de la membrana plasmática (MP), así como la presencia de mitocondrias (M) y de vesículas (VE) en el citoplasma (x15000). 35
- 14 Ultraestructura de plasmátocitos de *D. coccus* (15 d). **A** plasmátocitos de forma irregular con núcleos de forma variable (x6000). **B** ampliación de la anterior, nótese la presencia del nucléolo (NU); la cromatina (CM) se concentró en paquetes en la periferia de la membrana nuclear (MN) (x15000). **C** mayor magnificación, distíngase la irregularidad de la membrana plasmática (MP), la presencia en el citoplasma de mitocondrias (M) de gran tamaño y forma variable, RER y ribosomas (R) (x25000). 36
- 15 Ultraestructura de un plasmátocito de *D. coccus* (15 d). **A** plasmátocito de forma irregular y núcleo lobulado. **B** ampliación de mismo plasmátocito, nótese la gran cantidad de organelos, principalmente mitocondrias (M) de forma variable y la presencia del nucléolo (NU); la cromatina (CM) agrupada en paquetes cerca de la periferia de la membrana nuclear (MN). 37

16	Ultraestructura de plasmatocitos de <i>D. coccus</i> (15 d). A plasmatocito de forma irregular con núcleo (N) bilobulado (x7500). B ampliación del mismo plasmatocito, nótese el proceso de fagocitosis (x12000) C . ampliación de la zona, obsérvese la invaginación de la membrana plasmática para englobar el agente extraño (x75000).	38
17	Ultraestructura de un prohemocito (→) de <i>D. coccus</i> (15 d), obsérvese la forma irregular, con núcleo esférico que ocupa gran parte del citoplasma, nótese el tamaño pequeño en comparación a otros tipos celulares, como el granulocito (GR) ubicado en la parte inferior (x6000).	39
18	Ultraestructura de oenocitoides de <i>D. coccus</i> (15 d). A , B y C oenocitoides de forma irregular, nótese el citoplasma más electrodensos y núcleo irregular (x12000). D oenocitoide de forma irregular, con zonas electrodensas y dispersas de cromatina (x10000).	41
19	Hemocitos de <i>D. coccus</i> con la técnica de PAS (100x). A y B granulocitos, la reacción fue negativa para polisacáridos. C plasmatocitos reactivos a la técnica para polisacáridos.	43
20	Granulocitos de <i>D. coccus</i> con Sudán Negro B (100x). A y B la reacción positiva para lípidos fue variable en intensidad.	44
21	Plasmatocitos de <i>D. coccus</i> con Sudan Negro B (100x). A y B plasmatocitos ligeramente positivos a la prueba para lípidos.	45
22	Población de granulocitos de <i>D. coccus</i> en hembras de un día de vida adulta.	49
23	Población de granulocitos de <i>D. coccus</i> en hembras de diez de vida adulta.	49
24	Población de granulocitos de <i>D. coccus</i> en hembras de veinte días de vida adulta.	50
25	Población de granulocitos de <i>D. coccus</i> en hembras de treinta días de vida adulta.	50
26	Población de granulocitos de <i>D. coccus</i> en hembras de cuarenta días de vida adulta.	51
27	Población de granulocitos de <i>D. coccus</i> en hembras de cincuenta días de vida adulta.	51

RESUMEN

No obstante la demanda que existe por los derivados del ácido carmínico extraído de la grana cochinilla del nopal *Dactylopius coccus*, se desconoce la ruta metabólica de síntesis del pigmento en el insecto, aunque se ha señalado al tejido adiposo, la hemolinfa y los hemocitos como probable sitios de síntesis, siendo éstos últimos los que han causado más controversias, ya que considerando únicamente su citología, les han atribuido dicha función. Mediante microscopía de luz, de contraste de fases y electrónica, así como citoquímicas se caracterizaron los hemocitos en la hemolinfa de hembras adultas de *D. coccus*. Se determinaron granulocitos, plasmátocitos, prohemocitos y oenocitoides. Los granulocitos fue el tipo celular más abundante, de tamaño variable, con granulaciones en el citoplasma, gran cantidad de mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso, ribosomas y vesículas, núcleo central o excéntrico, esférico y en ocasiones lobulado. Los plasmátocitos se observaron polimórficos, con irregularidades en la membrana plasmática, citoplasma con mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso y vesículas, núcleo excéntrico, esférico o irregular. En ambos tipos de hemocitos se encontró escasa presencia de polisacáridos y lípidos. Los prohemocitos se observaron pequeños y esféricos, con citoplasma homogéneo, núcleo excéntrico y de gran tamaño. Los oenocitoides fueron de forma oval o irregular, citoplasma denso y homogéneo, núcleo excéntrico y alargado, ocasionalmente con presencia de un cristal. El porcentaje de granulocitos en los diferentes días de vida adulta de la hembra mostró diferencia significativa a uno y diez días de vida adulta, los plasmátocitos a los 30 y 50 días y los prohemocitos en los días uno y 50.

ABSTRACT

Despite the demand by products derived from the carminic acid extracted of the cochineal *Dactylopius coccus*, the metabolic route of synthesis of this pigment in the insect is unknown, although it has been indicated the faty body, the hemolymph and the hemocytes as probable synthesis sites, being the hemocytes those that have caused more controversies, since considering solely its cytology, it has been attributed this function to them. By light, and phases contrast of a compound microscope and electronic microscopy, as well as cytochemics, were characterized the hemocytes in hemolymph of adult females of *D. coccus*. Granulocytes, plasmatocytes, prohemocytes and oenocytoids were determined. The granulocytes were the more abundant cellular type and with the following characteristics: variable size, granulations in the cytoplasm, great amount of mitochondrias, rough endoplasmatic reticulum, ribosomes and vesicles, and a central or eccentric and sometimes lobulated spherical nucleus. The plasmatocytes were observed polymorphic, with irregularities in the plasmatic membrane, cytoplasm with mitochondria, rough endoplasmic reticulum and vesicles, and eccentric, spherical or irregular nucleus. In both types of hemocytes was little presence of polysaccharides and lipids. The prohemocytes were observed small and spherical, homogenous cytoplasm, and an eccentric nucleus of great size. The oenocytoids were oval or irregular in form, dense and homogenous cytoplasm, eccentric and extended nucleus, and occasionally with presence of a crystal. The percentage of hemocytes in different days of adult life of the female showed significant difference as following: granulocytes at one and ten days of adult life, plasmatocytes at 30 and 50 days and prohemocytes at one and 50 days.

1. INTRODUCCIÓN

Dactylopius coccus Costa (Hemiptera: Dactylopiidae), conocida como cochinilla fina, vive como parásita del nopal *Opuntia ficus-indica* L. Miller. La especie se caracteriza por la producción de ácido carmínico, que probablemente le sirve como defensa ante el ataque de depredadores (Horn, 1978; Eisner *et al.*, 1980). El contenido de ácido carmínico ($C_{22}H_{20}O_{13}$) en la hembra de *D. coccus* representa hasta el 25% del peso del insecto y es de gran aplicabilidad para dar color a ciertos alimentos, fármacos, cosméticos, así como indicador en análisis volumétrico, para la elaboración de tinciones histológicas y bacteriológicas, así como en la industria fotográfica y en la detección de metales raros (Zhang *et al.*, 2002).

El ácido carmínico se localiza en el hemocelo de *D. coccus*, pero hasta el momento se desconoce la ruta metabólica de síntesis (Hernández-Hernández *et al.*, 2005). Eisner *et al.* (1980) mencionan que el pigmento se encuentra en la hemolinfa y huevos, Chapman (1998) señala el tejido adiposo y la hemolinfa como fuentes del pigmento y Maza (1999) señala que las células del tejido adiposo probablemente contienen a éste. Joshi y Lambdin (1996) determinaron en *D. confusus* un tipo de granulocito modificado, en el cual la estructura subcelular se ha transformado para realizar síntesis y secreción especial y posiblemente esté involucrado en la síntesis del pigmento rojo; Aquino *et al.* (2002) señalan un tipo de hemocito en *D. coccus* al que llamaron “cromatocito” que suponen que contiene el pigmento y precursores de éste. Sin embargo, actualmente no hay información precisa para atribuir la participación de los hemocitos en la síntesis de ácido carmínico en Dactylopiidae.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar y describir los tipos de hemocitos en *D. coccus*, tomando en cuenta las características citológicas y morfológicas ultraestructurales mediante microscopía de contraste de fases, microscopía electrónica de transmisión y técnicas citoquímicas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de *Dactylopius coccus*

La familia Dactylopiidae contiene nueve especies del género *Dactylopius* de las cuales cinco de ellas se han reportado en México. Los dactilópodos se alimentan de cactáceas, principalmente de *Opuntia* spp. y *Nopalea* spp. (De Haro y Claps, 1995).

D. coccus es la especie con mayor contenido de ácido carmínico, por lo que es cultivada y cuidada con propósitos comerciales siendo las hembras adultas la materia prima para la extracción del colorante, el cual es de gran interés debido a sus diversos usos (Mora, 1996; Hernández-Hernández *et al.*, 2005).

2.2. Ciclo biológico de *D. coccus*

La hembra puede depositar tanto huevos como ninfas y en el primer caso la eclosión tiene lugar el mismo día de la oviposición. La ninfa I se desplaza para elegir un lugar en la penca de nopal donde fijarse e iniciar su alimentación y a los 28 a 30 días se presenta la primera muda y se origina la ninfa II, que después de 8 a 10 días vuelve a mudar para dar origen a la hembra adulta o al macho. La cópula se lleva a cabo a los 57 días y después de ésta la hembra incrementa su volumen considerablemente debido al desarrollo de los huevos en su interior. La fecundidad promedio es de 100 huevos viables. En el caso del macho la ninfa II forma un capullo que se transforma en prepupa y después en pupa y a los 27 días emerge el adulto que vive en promedio sólo tres días. En promedio, el ciclo total de vida es de tres meses en la hembra y de dos en el macho (Llenderal y Nieto, 2001).

2.3. Características del ácido carmínico

Es posible obtener cuatro productos a partir de *D. coccus*: cochinilla seca, extracto de cochinilla, carmín y ácido carmínico, cuyas características y aplicaciones son diversas (Mora, 1996). El ácido carmínico es el pigmento purificado y químicamente es una antraquinona unida a una glucosa por enlaces carbono-carbono “ácido 7- -D-glucopiranosil-3,5,6,8-tetrahidroxil-1-metil-9,10-dioxoantraceno-2-carboxílico” (Allevi *et al.*, 1998; Lambdin *et al.*, 2002). Es resistente a la luz, a la temperatura y tiene gran estabilidad. Es biológicamente seguro por lo que usa como colorante de alimentos (Brown, 1975; Jalón *et al.*, 1989).

El ácido carmínico forma complejos con varios metales, por lo que es empleado como indicador en reacciones de óxido-reducción y ácido-base, en la determinación espectrofotométrica y fluorimétrica de varios elementos, además de ser utilizado para teñir tejido nervioso y glucógeno (Panadero *et al.*, 1997; Favaro *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002).

2.4. Papel biológico del ácido carmínico

Se ha propuesto que el ácido carmínico ejerce una función biológica importante en *D. coccus*, Eisner *et al.* (1980) y Harborne (1988) mencionan la posibilidad de funciones defensivas ante ciertos depredadores, como el gusano telero *Laetilia coccidivora*, que almacena en su cuerpo el colorante y lo arroja cuando se ve amenazado por otros depredadores, también las hormigas *Monomorium destructor* son repelidas por este ácido; además, la cera blanca que recubre a los dactilópodos les proporciona protección contra los factores climáticos adversos y también puede ser un disuasivo alimentario.

Algunos estudios muestran que las cochinillas de mayor peso contienen menor concentración de ácido carmínico y ovipositan mayor número de huevos, situación que lleva a una relación inversa entre concentración de ácido carmínico y fecundidad (Rodríguez *et al.*, 2005). En relación a esto, Eisner *et al.* (1980) mencionan que dada la función defensiva del ácido carmínico, tal relación sugiere la existencia de un compromiso fisiológico entre la asignación de recursos a reproducción o a defensa.

2.5. Sistema inmunológico en insectos

La hemolinfa de los insectos, que circula en todo el cuerpo y baña directamente a los tejidos, está constituida de una parte líquida o plasma y de células sanguíneas o hemocitos. En la hemolinfa, el sistema inmune innato ejerce su función a través de la respuesta humoral y celular (Chapman, 1998; Barraco y Loch, 1991).

La respuesta humoral incluye la producción de péptidos y proteínas antimicrobiales, el sistema profenoloxidasa (proFO) y la compleja cascada enzimática que regula la melanización o coagulación de la hemolinfa, así como la producción de reactivos intermedios de oxígeno y nitrógeno (Gillespie *et al.*, 1997; Paskewitz y Gorman, 1999). La respuesta celular se refiere a la defensa mediada por hemocitos o células sanguíneas, a través de procesos como fagocitosis, encapsulación, nodulación y reparación de heridas (Gillespie *et al.*, 1997; Stanley, 1998). Ambas respuestas humoral y celular dependen una de la otra, ya que varios factores humorales afectan la función de los hemocitos y estos son fuente importante de muchas moléculas humorales (Ratcliffe y Rowley, 1979; Lavine y Strand, 2002). Russo *et al.* (1993) mencionan que las cápsulas formadas alrededor de los huevos o larvas del endoparásito *Epidinocarsis lopezi* en *Phanacoccus manihoti*, parecen ser

de tipo intermedio entre la inmunidad celular y humoral; las cápsulas no pueden ser de origen celular, ya que los granulocitos y los adipocitos no se unen totalmente a las capas construidas alrededor del parásito y no son de tipo humoral porque el material precipitado alrededor del parásito contiene fragmentos citoplasmáticos de hemocitos y enzimas lisosomales, tales como fosfatasa y enzimas líticas.

En cuanto al sistema inmune de *D. coccus*, García *et al.* (2002) determinaron que el ácido carmínico contenido en la hemolinfa, al estar en contacto con componentes de la pared celular de bacterias y hongos como el zymozan, provoca la formación de un coágulo y pérdida del color de la fase soluble, es decir, el ácido carmínico se consume durante esta reacción; también observaron que las células del cuerpo graso que contienen gránulos de ácido carmínico, al ser activadas por zymozan, se oscurecen por eventos de coagulación, originando que las células pierdan su integridad y liberen los gránulos al medio. Hernández-Hernández *et al.* (2003), al utilizar lamarina, zymozan y n-acetil glucosalina, observaron que el ácido carmínico es consumido como sustrato durante la coagulación y que ésta es inhibida por dexametasona, ácido acetil salicílico e indometacina y concluyeron que el sistema inmune de *D. coccus* está regulado por eicosanoides y sugieren que la activación de la profenoloxidasa (proFO) podría depender del ácido carmínico. González *et al.* (2002) observó en la cochinilla silvestre y su depredador *L. coccidivora*, que el ácido carmínico se consume durante la coagulación y que esto depende de la activación de la proFO.

2.6. Principales tipos de hemocitos

Los hemocitos se derivan del mesodermo embrionario y subsecuentemente se originan por división mitótica de hemocitos en circulación, principalmente los plasmaticos y granulocitos y por la actividad de los órganos hematopoiéticos (Chapman, 1998; Mori, 1979; Feir, 1979; Hoffmann *et al.*, 1979).

Se han descrito siete tipos de hemocitos en varios insectos: prohemocitos, plasmaticos, granulocitos, esferulocitos, adipohemocitos, oenocitoides y coagulocitos (Jones, 1979; Gupta, 1979, 1985). Otros tipos de hemocitos como los podocitos y los vermicitos se consideran variantes de los plasmaticos (Arnold, 1979; Gupta, 1979). Otros términos como células cristal (Lackie, 1988) y células gigantes (Azambuja *et al.*, 1991), no están consideradas como categorías. Russo *et al.* (1993) observaron modificaciones en los granulocitos. En *D. confusus* Joshi y Lambdin (1996) determinaron granulocitos típicos "T" y granulocitos modificados "M".

Russo *et al.* (1993) encontraron en *Phenacoccus manihoti* prohemocitos, oenocitoides y granulocitos, mientras que en *Planococcus citri* sólo se encontraron granulocitos. En *D. confusus*, Joshi y Lambdin (1996) identificaron prohemocitos, plasmaticos, oenocitoides, granulocitos "T" y granulocitos "M". Por su parte Llanderal y Nieto (2001) reportaron la presencia de prohemocitos, plasmaticos y granulocitos en *D. coccus*, mientras que Aquino *et al.* (2002) suponen la presencia de un hemocito llamado por ellos cromatocito, al que atribuyen la síntesis del colorante y sus precursores.

2.7. Funciones de los hemocitos

Fagocitosis: es un proceso de ingestión de virus, bacterias, hongos, protozoarios y tejidos autolisados (Gupta, 1985), siendo los plasmacitos y granulocitos los tipos principales de hemocitos implicados en este proceso (Ratcliffe y Rowley, 1979; Barraco y Loch, 1991; Hillyer *et al.*, 2003), aunque también han sido reportados los oenocitoides (Hillyer *et al.*, 2003) los esferulocitos y los adipohemocitos como fagocíticos (Gupta, 1985).

Encapsulación: es un proceso que aísla microorganismos extraños o inertes, que son muy grandes para ser fagocitados (Gupta, 1985). Los granulocitos y plasmacitos son los principales tipos involucrados en este proceso (Gillespie *et al.*, 1997), pero también se ha reportado la participación de los esferulocitos, coagulocitos y oenocitoides (Ratcliffe y Rowley, 1979; Lavine y Strand 2002).

Nodulación: mediante este proceso se confina a partículas animadas e inanimadas que normalmente no pueden ser fagocitadas (Gupta 1985). La secuencia incluye la formación de un núcleo melanizado o coágulo formado por la aglutinación y posterior lisis del granulocito y/o coagulocitos y la atracción de los plasmacitos por una respuesta quimiotáctica formando un nódulo o granuloma (Ratcliffe y Rowley 1979).

2.8. Técnicas citoquímicas

Los procedimientos químicos específicos no sólo sirven para caracterizar los diferentes tipos de hemocitos y sus gránulos, sino que proporcionan información acerca de la función de las células y sus inclusiones, además de que constituyen un complemento indispensable de la morfología óptica convencional. Estas técnicas de

tinción selectiva pueden ser utilizadas para localizar e identificar ciertos componentes químicos en el interior de los hemocitos, tales como enzimas, carbohidratos o lípidos (Ross *et al.*, 2005; Ashhurst, 1979; Sheehan y Hrapchak, 1980).

Reacción de ácido periódico-schiff (PAS). La técnica de PAS modifica químicamente las estructuras celulares y tiñe carbohidratos y macromoléculas ricas en carbohidratos (Ross *et al.*, 2005). Muchos hemocitos contienen gránulos citoplasmáticos compuestos de glicoproteínas y el glucógeno puede estar presente en el citoplasma (Ashhurst, 1979).

Sudán Negro B (lípidos). El sudán negro es un colorante neutro y no posee agrupamientos capaces de formar sales, característica que revela la presencia de grasas (Estrada *et al.*, 1982); se ha determinado que en los hemocitos es específico para fosfolípidos (Ashhurst, 1979).

2.9. Técnicas microscópicas

Para la observación y determinación de los tipos de hemocitos, las diversas técnicas microscópicas son una herramienta útil para interpretar de manera detallada la microanatomía de los tipos celulares y correlacionar la estructura con su función (Ross *et al.*, 2005). Los hemocitos una vez extraídos del organismo, se pueden lisar y coagular, pero aun así pueden ser observados en preparaciones en fresco, en preparaciones fijadas y teñidas, en cortes especiales ultradelgados y en cultivos de hemocitos (Baerwald, 1979).

2.9.1. Microscopía de luz (Método Panóptico de Pappenheim)

El microscopio óptico en la gran mayoría de los casos se utiliza para examinar especímenes transparentes y finos, ya sea en el modo de campo claro, o luz transmitida. El espécimen tiene que proporcionar suficiente contraste para detallar su contenido, ya que cierta cantidad de luz es absorbida al atravesar la muestra y en caso de que el contraste no sea útil, se utilizan diversas técnicas de coloración o tinción, algunas de ellas específicas para el contenido celular (Madigan *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2005).

Las técnicas de tinción son herramientas importantes para diferenciar estructuras morfológicas de la célula, como núcleo, citoplasma y granulaciones, debido a que presentan una fuerte afinidad a los colorantes. Con este método de tinción general para frotis, se utilizan colorantes neutros como Giemsa y May-Grünwald, que modifican la estructura celular de forma física o química y ofrecen información acerca de su constitución (Estrada *et al.*, 1982; Arnold y Hinks, 1979) Shapiro (1979) menciona que la tinción de frotis de hemocitos con Giemsa y May-Grünwald brinda resultados satisfactorios.

2.9.2. Microscopía de contraste de fases

La microscopía de contraste de fases es una herramienta útil para determinar los tipos de hemocitos, ya que permite la observación de la estructura real de las células, excluyendo las alteraciones morfológicas que en ocasiones se presentan en el material fijado y teñido (Estrada *et al.*, 1982), que pueden dar lugar a falsas interpretaciones, como que los tipos celulares son distintos por la variación en apariencia, debido a la técnica empleada (Chapman, 1998).

El microscopio de contraste de fases sirve para examinar células vivas, hace visibles los hemocitos que prácticamente son transparentes sin necesidad de teñir, permite la observación de sus actividades, tales como fagocitosis, migración de tipo amiboide, mitosis y pinocitosis y permite una visión clara de los gránulos citoplasmáticos, además de que se utiliza para realizar observaciones de cultivos de hemocitos (Baerwald 1979; Estrada *et al.*, 1982; Ross *et al.*, 2005).

2.9.3. Microscopía electrónica de transmisión

La microscopia electrónica de transmisión proporciona imágenes por medio de un haz de electrones acelerados, que irradian una muestra delgada por una de sus caras, obteniéndose una imagen formada por los electrones que emergen por la cara contraria, de modo que aporta datos morfológicos y analíticos de las células (Vázquez y Echeverría, 2000).

La preparación de las muestras para observar con esta técnica requiere métodos refinados, es decir, con un alto grado de conservación de la estructura subcelular; procesos tales como la formación de cápsulas por los hemocitos son bastante visibles (Ross *et al.*, 2005; Baerwald, 1979; Russo *et al.*, 1993).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

Se identificaron los tipos de hemocitos en hembras adultas oviplenas de *D. coccus*, previamente determinadas con las claves de De Haro y Claps (1995). En el invernadero utilizado para la cría de grana cochinilla, del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, se infestaron las pencas de nopal (*Opuntia ficus-indica*) por el método de bolsa de tul y las pencas se colocaron colgadas verticalmente a 1m sobre el nivel del suelo; la colonia se mantuvo a una temperatura promedio de 20 °C y 70% de humedad relativa (Aldama-Aguilera y Llanderal-Cázares, 2003, Campos-Figueroa y Llanderal-Cázares, 2003).

3.2. Caracterización citoquímica

3.2.1. Detección de polisacáridos (Técnica de PAS)

Para esta prueba, se obtuvo hemolinfa de hembras con edades indistintas, se desprendió una de las patas anteriores del insecto entre el fémur y la tibia, se depositó una gota sobre un portaobjetos, e inmediatamente se procedió a realizar 10 frotis, el método empleado es el descrito por Estrada *et al.* (1982), que consiste en fijar con formol-calcio durante 30 minutos, lavar con agua corriente durante 2 h, oxidar con ácido peryódico 0.5% durante 10 minutos, lavar con agua corriente durante 5 minutos y después con agua destilada por 1 minuto. Posteriormente los frotis se introdujeron en reactivo de Schiff por 30 minutos (tapado y a la oscuridad), se enjuagaron tres veces sucesivas en agua sulfurosa durante 1 minuto, se lavaron con agua corriente por 5 minutos y después con agua destilada por 1 minuto,

sucesivamente se deshidrataron con alcohol 70%, 96% y absoluto, se aclararon con xilol y se montaron en resina histológica.

3.2.2. Lípidos (Sudán Negro B)

En este caso, se extrajo la hemolinfa cuando las hembras tenían 5, 10, 15 y 20 d de vida adulta y se realizaron 12 frotis, tres para cada edad. Los intervalos de tiempo se establecieron considerando que entre la emergencia y los 20 d de edad de las hembras, tienen lugar varios procesos que incluyen el apareamiento y el inicio del desarrollo de los oocitos, que implican cambios metabólicos y requerimientos nutricionales. Para determinar la presencia de lípidos en los hemocitos, se utilizó la técnica de Sudán Negro B descrita por Estrada *et al.* (1982) con el siguiente procedimiento: fijado de los frotis en formol-calcio durante 1 h; lavado del fijador durante 2 h; paso por alcohol 70% aproximadamente por 2 minutos; teñido con solución saturada de Sudán Negro B en alcohol al 70% por 30 minutos; enjuague con alcohol 70% durante 1 minuto; lavado rápido en agua corriente, lavado cuidadoso con agua destilada y finalmente montaje en resina histológica.

La observación del material y fotografías para la detección polisacáridos y lípidos, se realizó en el Centro de Microscopía de La Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, con un microscopio Axiophot 1 Zeiss, una cámara digital ZVS-47 D E y el programa de captura KS400 versión 3.01.

3.3. Técnicas microscópicas

3.3.1. Microscopía de luz (Método Panóptico de Pappenheim)

Para esta parte del estudio se utilizaron las hembras adultas de 1, 10, 20, 30, 40 y 50 d de vida adulta. Los intervalos de tiempo se establecieron considerando que en los primeros 10 d tiene lugar el apareamiento e inicia la maduración de los oocitos, mientras que la ovipostura tiene lugar entre los 20-30 d y termina entre los 40 y 50 d. Los frotis se secaron al aire por 3 minutos y se fijaron con alcohol metílico al 100% durante 10 minutos. Para cada edad de las hembras se hicieron 10 laminillas. La tinción se hizo con el método Panóptico de Pappenheim (Estrada *et al.*, 1982), de acuerdo con el cual se agregaron 10 gotas de colorante de May-Grünwald durante 3 minutos, se añadió la misma cantidad de agua destilada y se dejó actuar durante 1 minuto, posteriormente se eliminó el líquido y se agregó solución recién preparada de Giemsa por 15 minutos. Los frotis se lavaron con agua corriente hasta eliminar los residuos de colorante, los cuales fueron utilizados para determinar y describir los tipos de hemocitos en la hemolinfa de *D. coccus*, mediante el registró de su forma, tamaño y la posición del núcleo.

La caracterización fotográfica se realizó en el Laboratorio de Morfología de Insectos, del Colegio de Postgraduados con un Fotomicroscopio III Carl Zeiss, una cámara digital para microscopía "Pixera Professional" y el programa de captura Pixera View Finder.

3.3.2. Microscopía de contraste de fases

Se depositó una gota de hemolinfa sobre un portaobjetos con solución Ringer para insectos (NaCl 8.60 g, KCl 0.30 g y CaCl_2 0.33 g en 1000 mL agua destilada) y se procedió a observar la preparación.

La observación del material y fotografías se hizo en el Centro de Microscopía de La Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, con un microscopio Axiophot 1 Zeiss, una cámara digital ZVS-47 D E y el programa de captura KS400 versión 3.01.

3.3.3. Microscopía electrónica de transmisión

Para caracterizar los hemocitos, se obtuvo la hemolinfa de 10 hembras de *D. coccus*. La hemolinfa se colectó con una micropipeta y se depositó directamente en cápsulas de Been, en las que se agregaron 5 gotas de gluteraldehído 2% para la fijación que duró 2 h, tiempo en el que se formó un precipitado; a continuación se eliminó el sobrenadante de las muestras y se lavaron con 5 gotas de PBS-sacarosa por tres ocasiones durante 10 minutos; una fijación posterior se realizó con OsO_4 1% por 2 h y concluido este tiempo se lavaron las muestras tres veces con PBS-sacarosa como ya se describió anteriormente; luego se procedió a deshidratar gradualmente con alcoholes de 10% hasta 90% durante 10 minutos cada uno y con alcohol absoluto se realizaron tres cambios de 30 minutos; posterior a esto se agregaron alcohol absoluto-óxido de propileno en relación 2:1, 1:1 y 1:2, finalizando con óxido de propileno al 100%, los cambios en cada etapa duraron 30 minutos; el siguiente paso consistió en adicionar óxido de propileno-Epon 812 en proporción 2:1, 1:1 y 1:2, con cambios que duraron 30 minutos, con Epon 812 al 100% se dejó 4 h

con recipiente abierto para que el disolvente se evaporara y concluido este tiempo se polimerizaron a 60°C durante 24 h. Cada bloque se sacó de las cápsulas, se le dio forma de pirámide en el ultramicrotomo y se realizaron los cortes semifinos, los cuales se colocaron en rejillas y se contrastaron con acetato de uranilo y con citrato de plomo.

Los tipos celulares se fotografiaron en el Centro de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, con un microscopio electrónico de transmisión modelo Joel JEM-1010.

3.4. Variación cuantitativa de los tipos de hemocitos en los diferentes días de vida adulta de *D. coccus*.

El conteo diferencial en cada edad se realizó en las muestras teñidas con el método Panóptico. Para cada edad se utilizaron 10 frotis, en cada uno de ellos se contaron en promedio 100 células y se obtuvieron los porcentajes de cada tipo celular. La comparación entre las distintas edades se realizó mediante el análisis de varianza ($\alpha \leq 0.05$).

En el caso de los granulocitos que fue el tipo más abundante y con mayor variación en tamaño, se hizo la comparación entre los diferentes días de vida adulta de la hembra, se consideraron 30 imágenes por cada edad, haciendo un total de 180. A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza ($\alpha \leq 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1. Morfología de los hemocitos de *D. coccus*

Con las diversas técnicas se pudo caracterizar en la hemolinfa de *D. coccus* **granulocitos, plasmaticos, prohemocitos y oenocitoides.**

4.1.1. Microscopía de luz (Método Panóptico de Pappenheim)

GRANULOCITOS

La membrana plasmática de estos hemocitos está bien definida. Los granulocitos generalmente se observaron esféricos y ovoides (Figura 1A y B), de tamaño variable (Cuadro1). El citoplasma con granulaciones poco densas, regularmente distribuidas con características acidófilas (coloración rosa) y ocasionalmente se notaron granulaciones basófilas (tono azul), distribuidas en forma irregular en la célula (Figura 1E). El núcleo se ubicó central o excéntrico, de tamaño variable, de forma esférica, alargado, lobulado, o formando paquetes de cromatina con afinidad fuertemente basófila (Figura 1C, D, E y F). La relación núcleo citoplasma es de 0.30.

Cuadro 1. Tamaño de los granulocitos encontrados en hembras de *D. coccus*.

FORMA	DIÁMETRO (µm)		
	Máx	Med	Min
Esférica			
Célula	27.12 ± 0.27	15.35 ± 0.17	5.70 ± 0.05
Núcleo	7.00 ± 1.2	5.34 ± 0.12	2.00 ± 0.07
Ovalada			
Célula	27.7 x 34.58	23.13 x 27.59	3.84 x 4.09
Núcleo	16.51 x 13.25	8.84 x 8.91	1.62 x 1.77

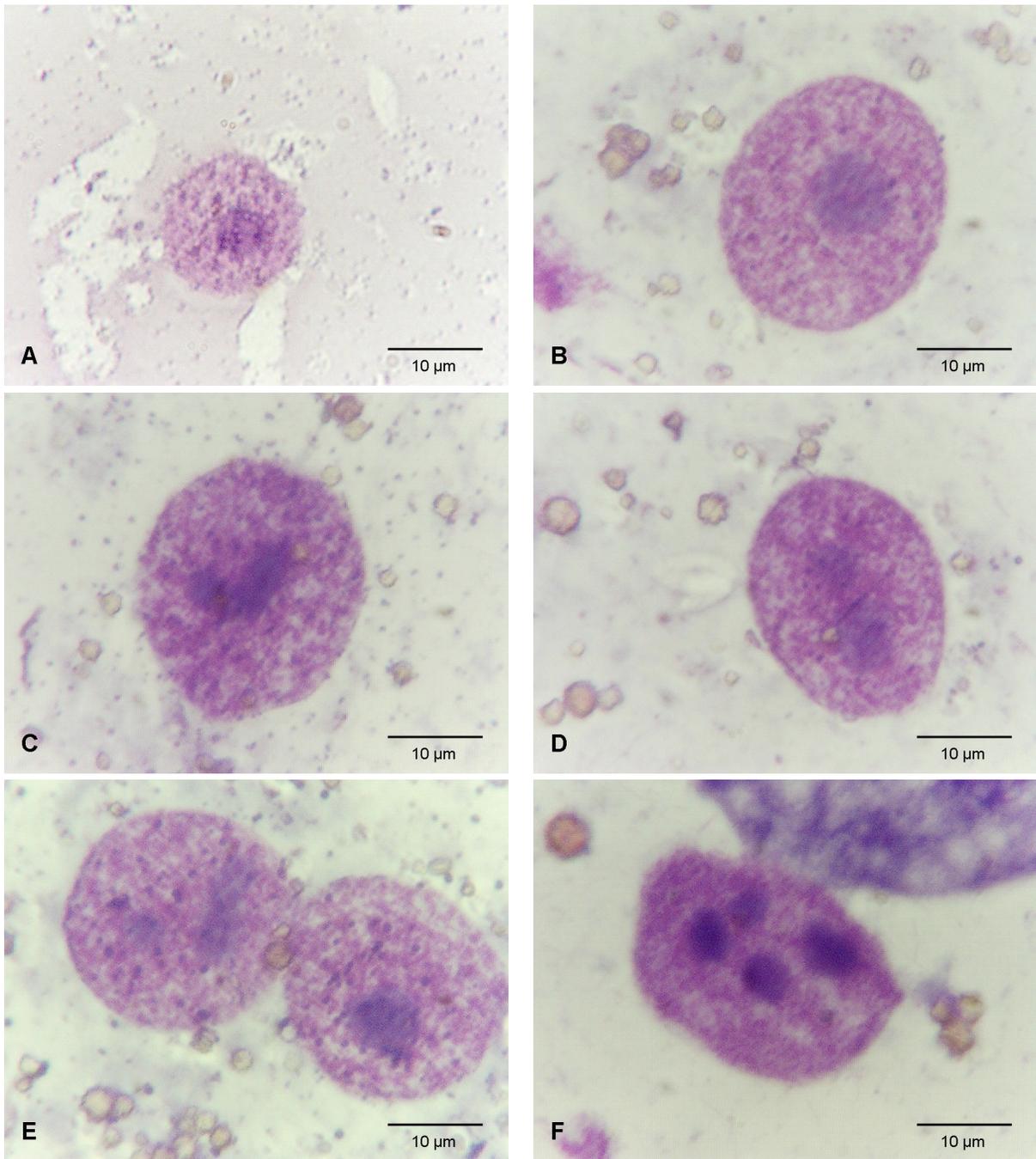


Figura 1. Granulocitos de *D. coccus* teñidos con Giemsa y May-Grünwald, nótese el citoplasma con gránulos principalmente acidófilos y núcleo basófilo (100x). **A** granulocito pequeño, encontrado en hembras de un día de vida adulta. **B** granulocito oval grande, con núcleo esférico. **C** y **D** granulocitos con núcleo lobulado. **E** dos granulocitos esféricos, con núcleo excéntrico. **F** granulocito con el núcleo formando paquetes de cromatina. Los hemocitos en las figuras **B**, **C**, **D**, **E** y **F** corresponden a hembras de 50 días de vida adulta (50 d).

PLASMATOCITOS

Los plasmatocitos se distinguieron por su forma polimórfica principalmente fusiforme, oval o esférica, así como por las irregularidades de su membrana plasmática (Figura 2A, B y C); el citoplasma fue basófilo y se observó poco denso, a veces con granulaciones finas y numerosas vesículas (Figura 2D). Se distinguió el núcleo excéntrico o central, con la presencia de cromatina con características acidófilas (Figura 2E y F). La relación núcleo citoplasma es de 0.20. La variación en el tamaño de estas células se observa en el Cuadro 2, es importante mencionar que ocasionalmente se encontraron plasmatocitos de más de 100 μm de largo.

Cuadro 2. Tamaño de los plasmatocitos encontrados en hembras de *D. coccus*.

FORMA	DIÁMETRO (μm)		
	Máx	Med	Min
Esférica			
Célula	23.79 \pm 2.47	11.75 \pm 0.58	6.40 \pm 0.10
Núcleo	4.60 \pm 0.46	2.57 \pm 0.25	1.95 \pm 0.16
Fusiforme			
Célula	5.28 x 44.11	4.71 x 20.20	6.02 x 12.54
Núcleo	4.11 x 5.16	1.47 x 3.66	2.80 x 3.20

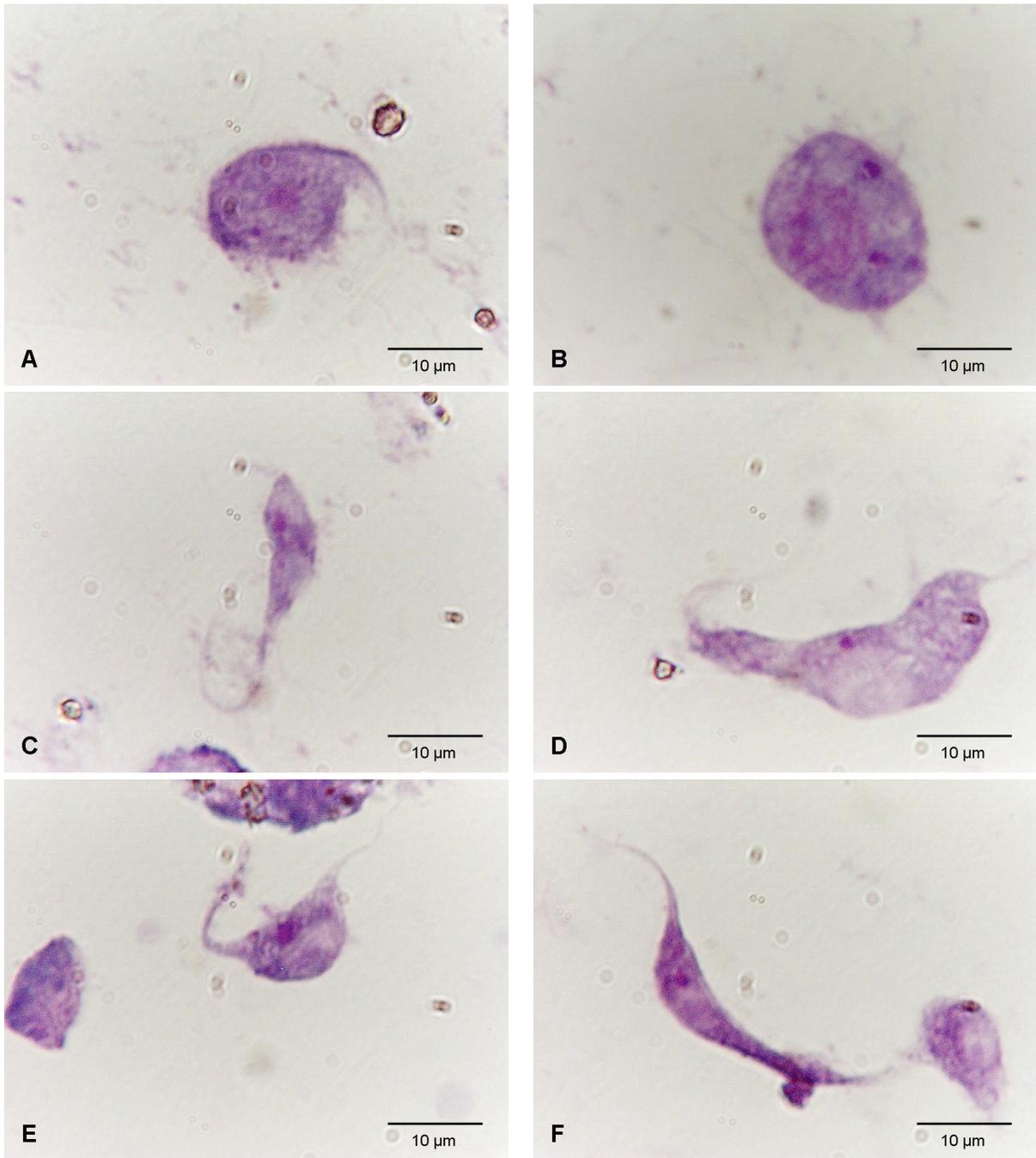


Figura 2. Plasmacitocitos de *D. coccus* teñidos con Giemsa y May-Grünwald, nótese el citoplasma con características basófilas y núcleo acidófilo (100x). **A** plasmacitocito de forma oval, con núcleo central (1 d). **B** plasmacitocito esférico, con núcleo excéntrico (50 d). **C, D, E** y **F** plasmacitocitos fusiformes (1 d).

PROHEMOCITOS

Este tipo de hemocitos se observaron esféricos y sumamente pequeños (Figura 3A, B y C). Con la tinción Panóptica el citoplasma presentó características homogéneas y basófilas, mientras que el núcleo, central o excéntrico, mostró afinidad acidófila y abarcó gran parte del citoplasma (Figura 3D, E y F). La relación núcleo citoplasma fue de 0.80, en general son células pequeñas, en el cuadro 3 se indican los tamaños.

Cuadro 3. Tamaño de los prohemocitos encontrados en hembras de *D. coccus*.

	DIÁMETRO (μm)		
	Máx	Med	Min
Célula	8.50 x 10.25	4.76 x 5.02	2.30 x 2.40
Núcleo	4.61 x 6.03	2.9 x 3.33	2.18 x 2.25

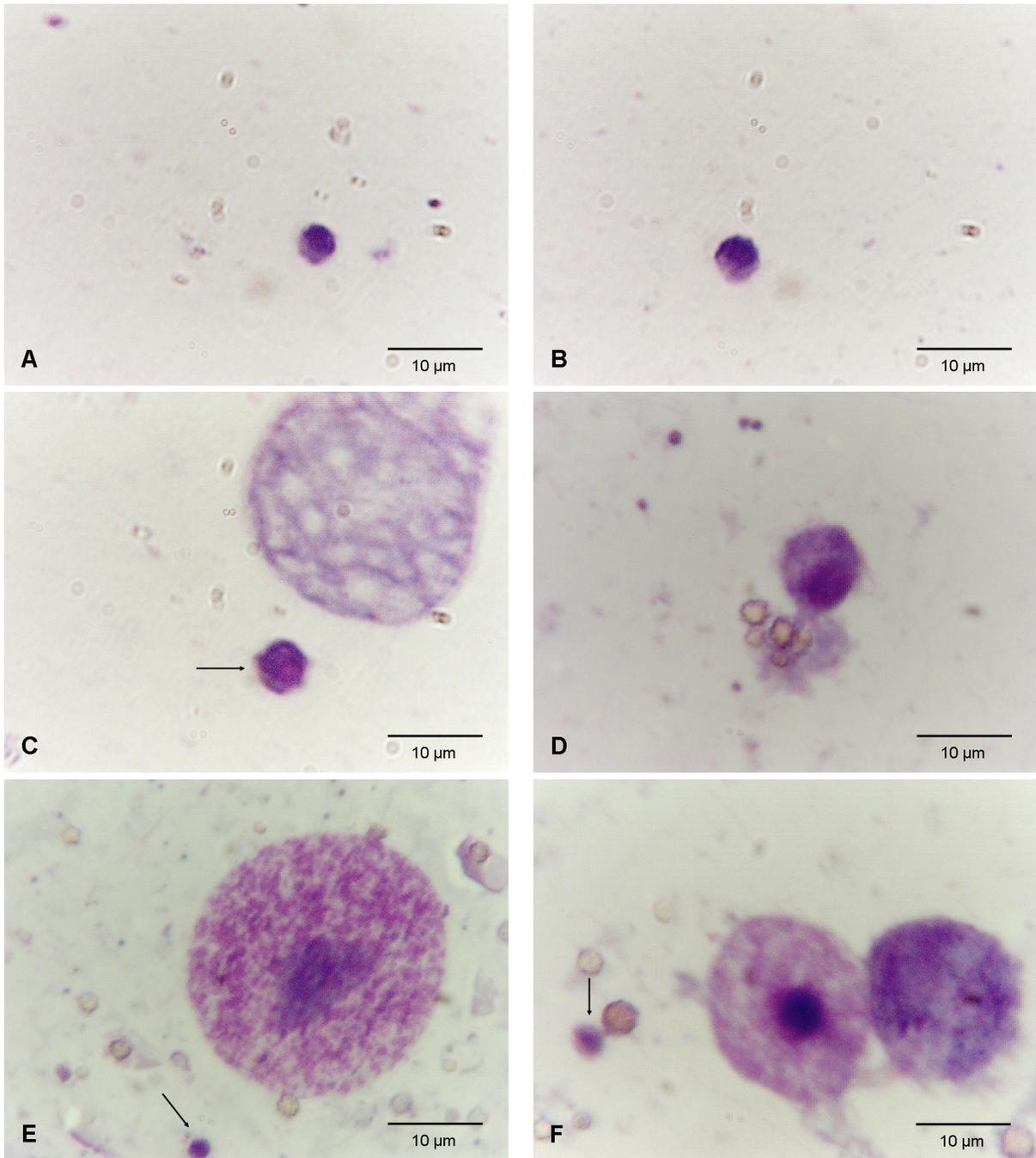


Figura 3. Prohemocitos () de *D. coccus* teñidos con Giemsa y May-Grünwald nótese el citoplasma basófilo y núcleo acidófilo (100x). **A, B y C** prohemocitos, obsérvese que el núcleo ocupa gran parte del citoplasma (1 d). **D, E y F** prohemocitos con núcleo excéntrico o central, adviértase el tamaño en comparación con los granulocitos y plasmatocitos ubicados a la derecha (50 d).

4.1.2. Microscopía de contraste de fases (MCF)

GRANULOCITOS

Con **MCF** el contorno de la membrana plasmática se observó con bordes regulares (Figura 4A). La forma de estas células fue esférica u oval. El citoplasma se caracterizó por la presencia de gránulos densos y abundantes de distintos tamaños, ocasionalmente concentrados en la periferia de la membrana citoplasmática (Figura 4B, C, D y E). El núcleo es pequeño, generalmente central y denso, de forma esférica, aunque esporádicamente se observó parcialmente lobulado o formando grandes paquetes de cromatina (Figura 4F, G y H). Midieron aproximadamente $25.15 \pm 2.97 \mu\text{m}$ de ancho, $28.15 \pm 1.94 \mu\text{m}$ de largo; su núcleo midió $10.81 \pm 1.09 \mu\text{m}$ de ancho por $13.9 \pm 2.26 \mu\text{m}$ de largo. Asimismo se detectó la presencia de granulocitos mayores de $50 \times 40 \mu\text{m}$ (Figura 4E).

PLASMATOCITOS

Estos hemocitos se observaron polimórficos y de tamaños variables. El citoplasma fue poco denso, translúcido, con vesículas y pocos gránulos o inclusiones (Figura 5A, B, C y D). El núcleo definido, central u ocasionalmente excéntrico, esférico y con la cromatina difusa, con nucléolo y raramente sin él; se observaron pocos plasmatocitos binucleados (Figura 5E y F). Su diámetro aproximado fue de $20.88 \pm 7.93 \mu\text{m}$ de ancho por $24.88 \pm 8.32 \mu\text{m}$ de largo; el núcleo midió $8.81 \pm 1.56 \mu\text{m}$ de ancho por $9.32 \pm 1.42 \mu\text{m}$ de largo.

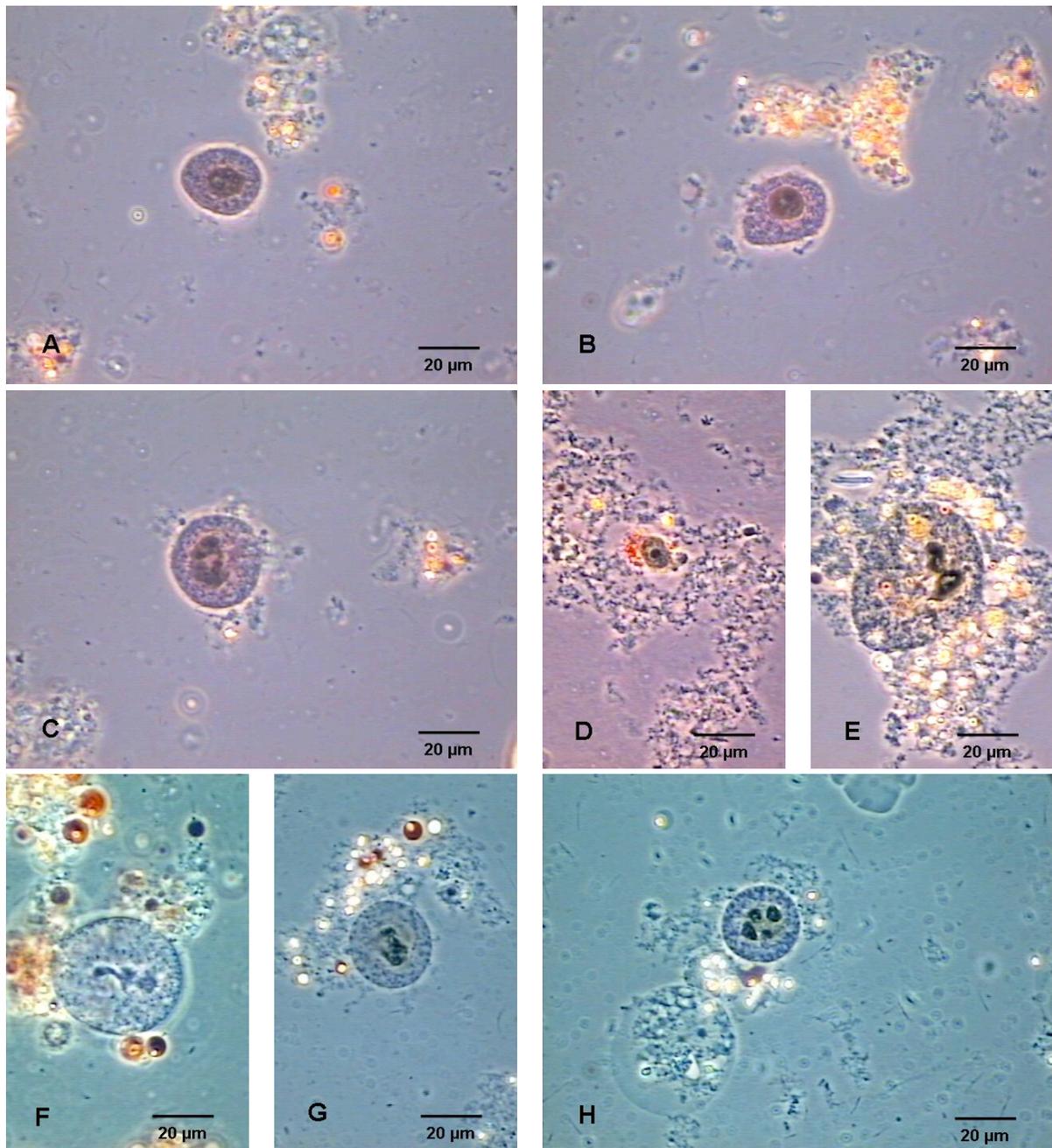


Figura 4. Granulocitos de *D. coccus* caracterizados con microscopía de contraste de fases (100x). **A** y **B** granulocitos de forma oval, con núcleo central y esférico (30 d). **C** granulocito esférico, con núcleo excéntrico y parcialmente lobulado (30 d). **D** granulocito pequeño con núcleo central (20 d). **E** granulocito grande alargado, con núcleo lobulado con gránulos de distinto tamaño en el citoplasma, concentrados en la periferia de la membrana citoplasmática (50 d). **F** y **G** granulocitos esféricos mostrando el núcleo lobulado, (50 d). **H** granulocito en el que se observa la cromatina en grandes paquetes.

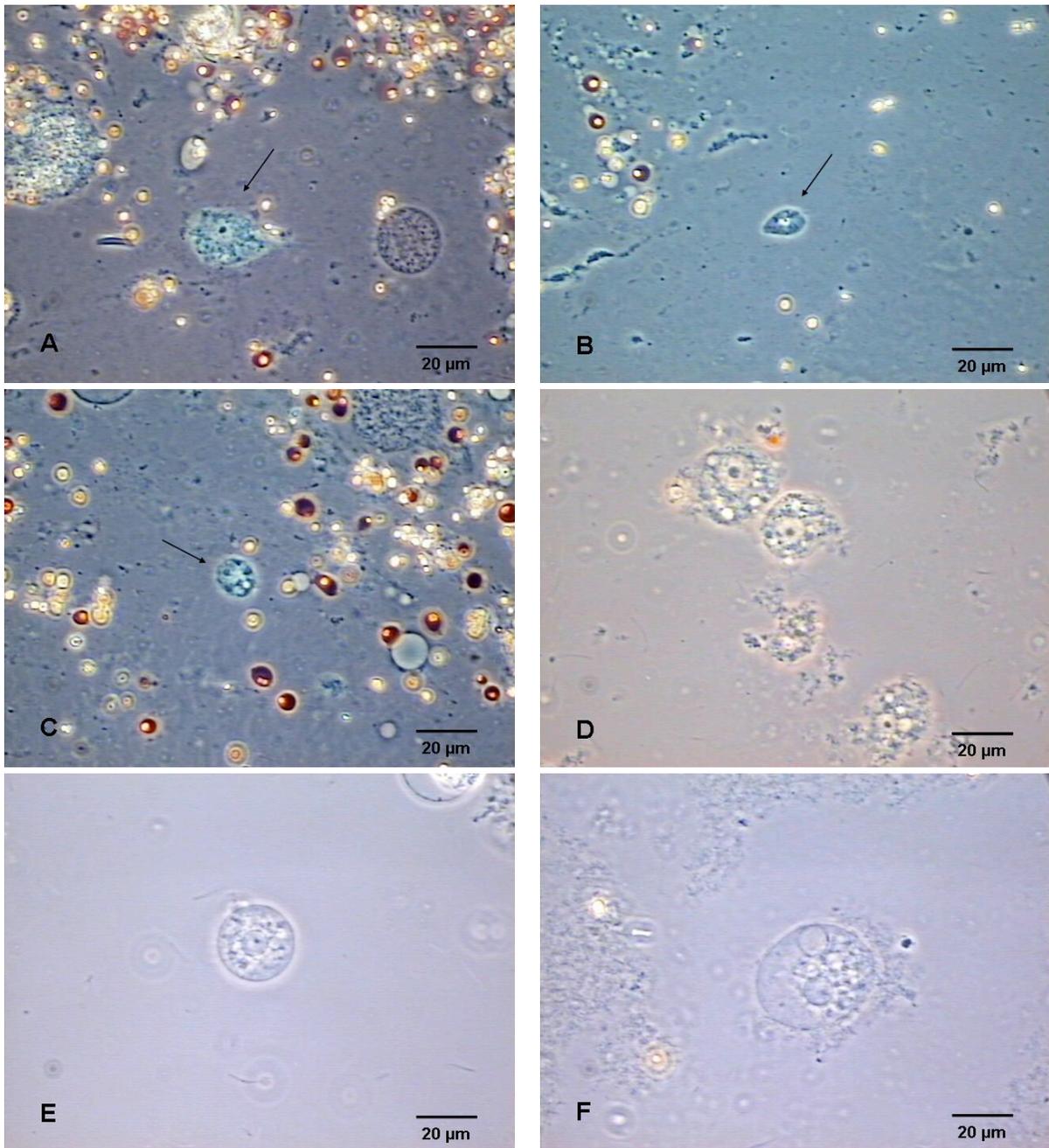


Figura 5. Plasmatocitos () de *D. coccus* caracterizados con microscopía de contraste de fases (100x). **A y B** plasmatocitos ovales típicos (20 d). **C** plasmatocito pequeño esférico con núcleo excéntrico (20 d). **D** plasmatocitos en los que se nota la cromatina en el núcleo y son evidentes las vesículas en el citoplasma (30 d). **E** plasmatocito esférico con núcleo central (40 d). **F** plasmatocito binucleado (40 d).

PROHEMOCITOS

La **MCF** evidenció que los prohemocitos son células pequeñas y esféricas, con el citoplasma uniforme; el núcleo de forma esférica, excéntrico y denso, ocupando gran parte del citoplasma (Figura 6). Fue un tipo de hemocito sumamente escaso, además de que por su tamaño pequeño se dificultó su localización, midieron aproximadamente $6.84 \pm 0.05 \mu\text{m}$ de diámetro y el tamaño del núcleo fue de alrededor de $5.92 \pm 0.66 \mu\text{m}$.

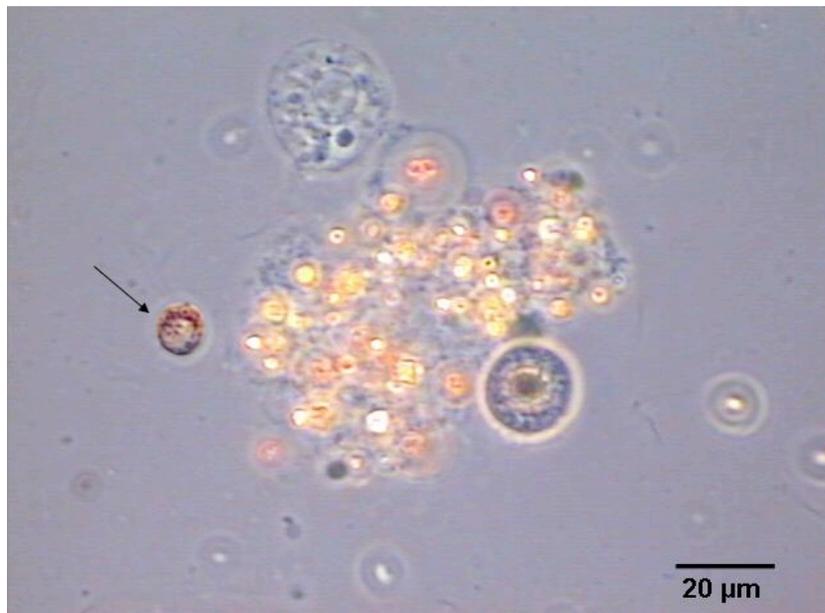


Figura 6. Prohemocito () de *D. coccus* caracterizado con microscopía de contraste de fases (100x), a la derecha abajo un granulocito y arriba un plasmatocito (50 d).

OENOCITOIDES

La membrana plasmática se observó regular, su forma fue oval, miden en promedio 12 x 15 μm . En el citoplasma se distinguieron pequeñas vesículas en poca cantidad, se denotó la presencia de un cristal ligeramente excéntrico (Figura 7).



Figura 7. Oenocitoide de *D. coccus* caracterizado con microscopía de contraste de fases (100x), nótese la presencia de un cristal.

En la hemolinfa de *D. coccus* con MCF, se observaron corpúsculos de ácido carmínico formando conglomerados alrededor de los hemocitos (Figura 8).

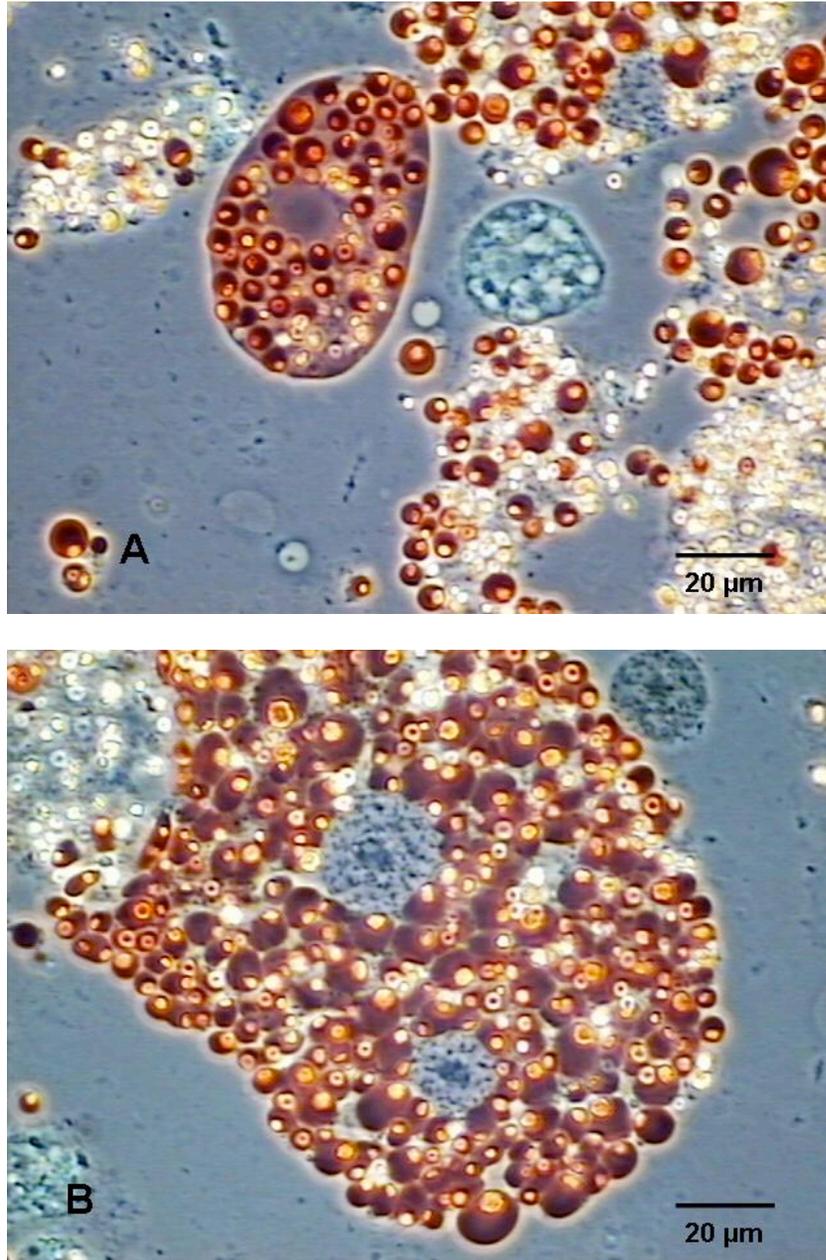


Figura 8. Vista de una muestra de hemolinfa de *D. coccus* con microscopía de contraste de fases (100x). **A** corpúsculos de ácido carmínico alrededor de un hemocito y a la derecha un plasmatocito. **B** conglomerado de corpúsculos de ácido carmínico alrededor de dos granulocitos.

4.1.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

GRANULOCITOS

La **MET** reveló que el contorno de la membrana plasmática de estos hemocitos generalmente es regular, ocasionalmente con ligeras proyecciones o pequeños pseudópodos (Figura 9). Los granulocitos se observaron de forma esférica u oval y de tamaño variable (Figura 10A y 11A). El citoplasma fue poco denso y en él se detectaron numerosas mitocondrias bien desarrolladas, de tamaño y forma variable, retículo endoplásmico rugoso, ribosomas dispersos, pocas vesículas y granulaciones distribuidas uniformemente en todo el citoplasma; la cromatina se observó en pequeños paquetes aledaña a la membrana nuclear (Figura 10B, C y 11B). Un núcleo excéntrico o central, largo o lobulado (Figura 12A, B, C y D). Midieron aproximadamente $10.76 \pm 1.71 \mu\text{m}$ de ancho, $12.82 \pm 1.63 \mu\text{m}$ de largo; el núcleo fue de $4.53 \pm 1.50 \mu\text{m}$ de ancho y $6.48 \pm 1.27 \mu\text{m}$ de largo.



Figura 9. Granulocito de *D. coccus* caracterizado con microscopía electrónica de transmisión (15 d). Célula oval con núcleo (N) excéntrico y lobulado, con nucléolo (NU), presencia en el citoplasma de mitocondrias (M) de forma y tamaño variable (x75000).

Figura 10. Ultraestructura de un granulocito de *D. coccus* (15 d). **A** granulocito con núcleo (N) excéntrico (x10000). **B** ampliación del mismo granulocito, nótese la presencia de mitocondrias (M) de tamaño variable, retículo endoplasmático rugoso (RER) y vesículas (VE) (x25000). **C** aumento de otra zona del mismo granulocito, nótese en el citoplasma RER y ribosomas (R) dispersos. La cromatina (CM) se concentra en la periferia de la membrana nuclear (MN) (x50000).

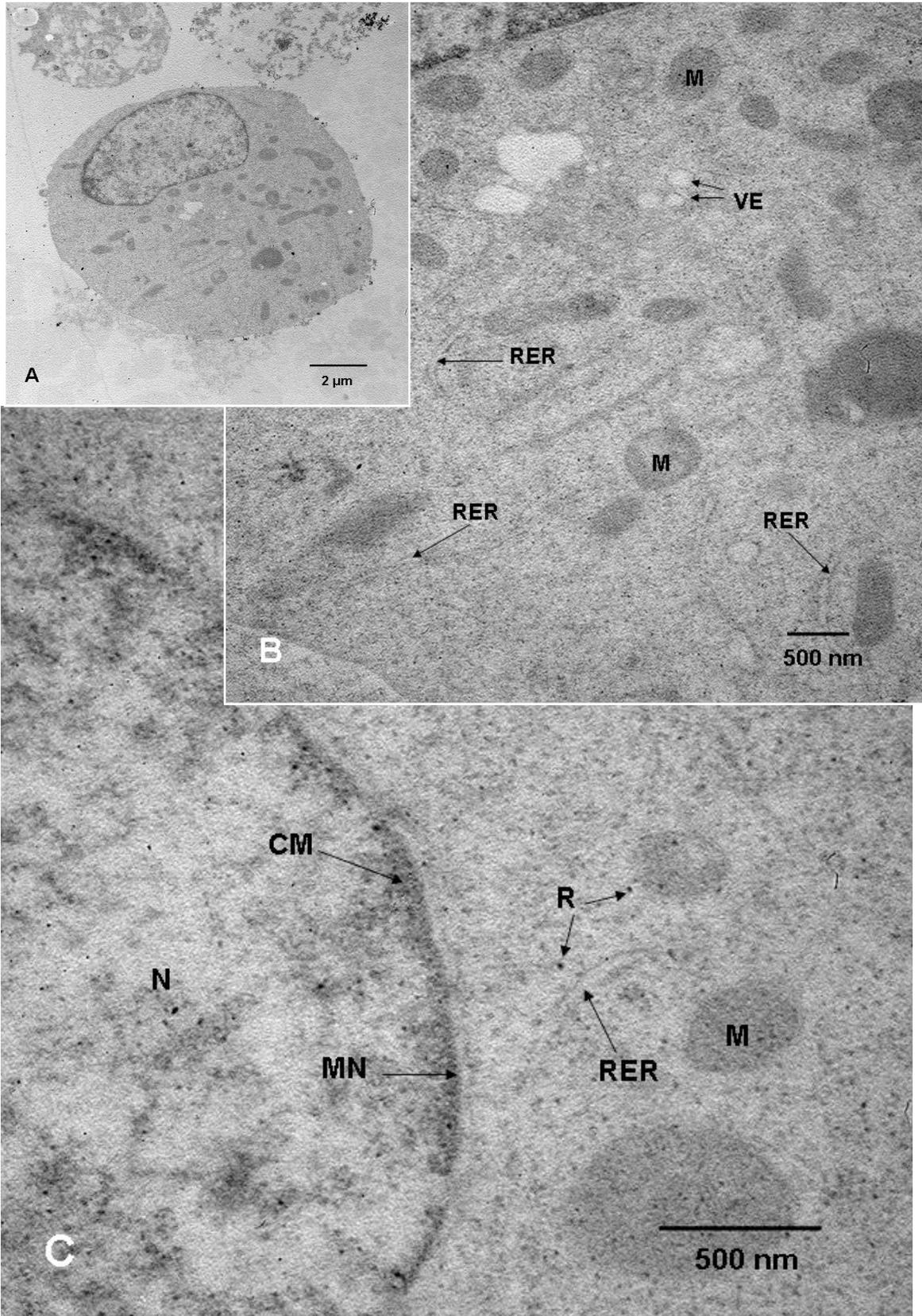


Figura 10

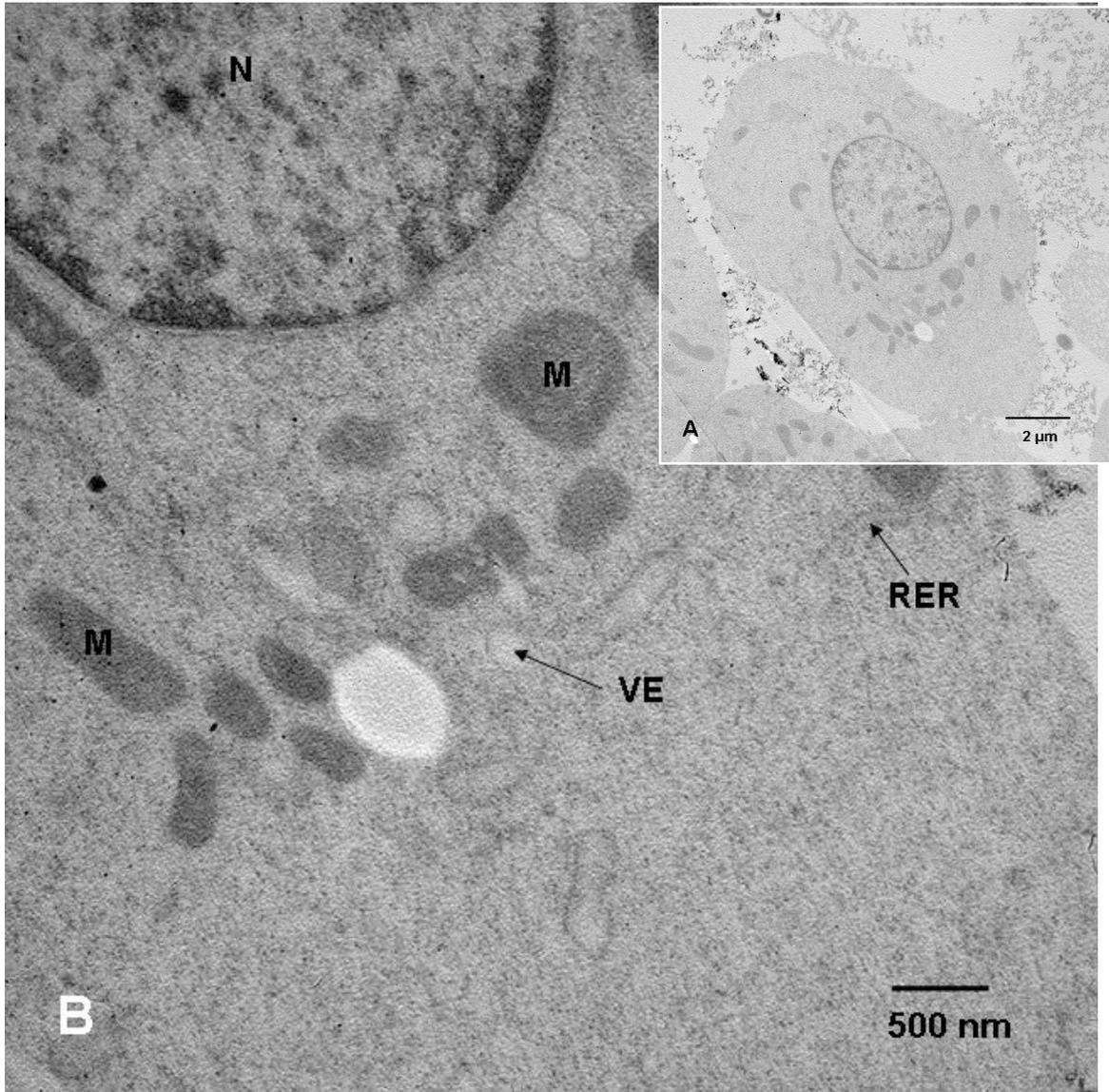


Figura 11. Ultraestructura de un granulocito de *D. coccus* (15 d). **A** granulocito oval, con núcleo central (x10000). **B**. Aumento del mismo granulocito, nótese la presencia de mitocondrias (M), retículo endoplasmático rugoso (RER), ribosomas (R) dispersos y vesículas (VE) (x25000).

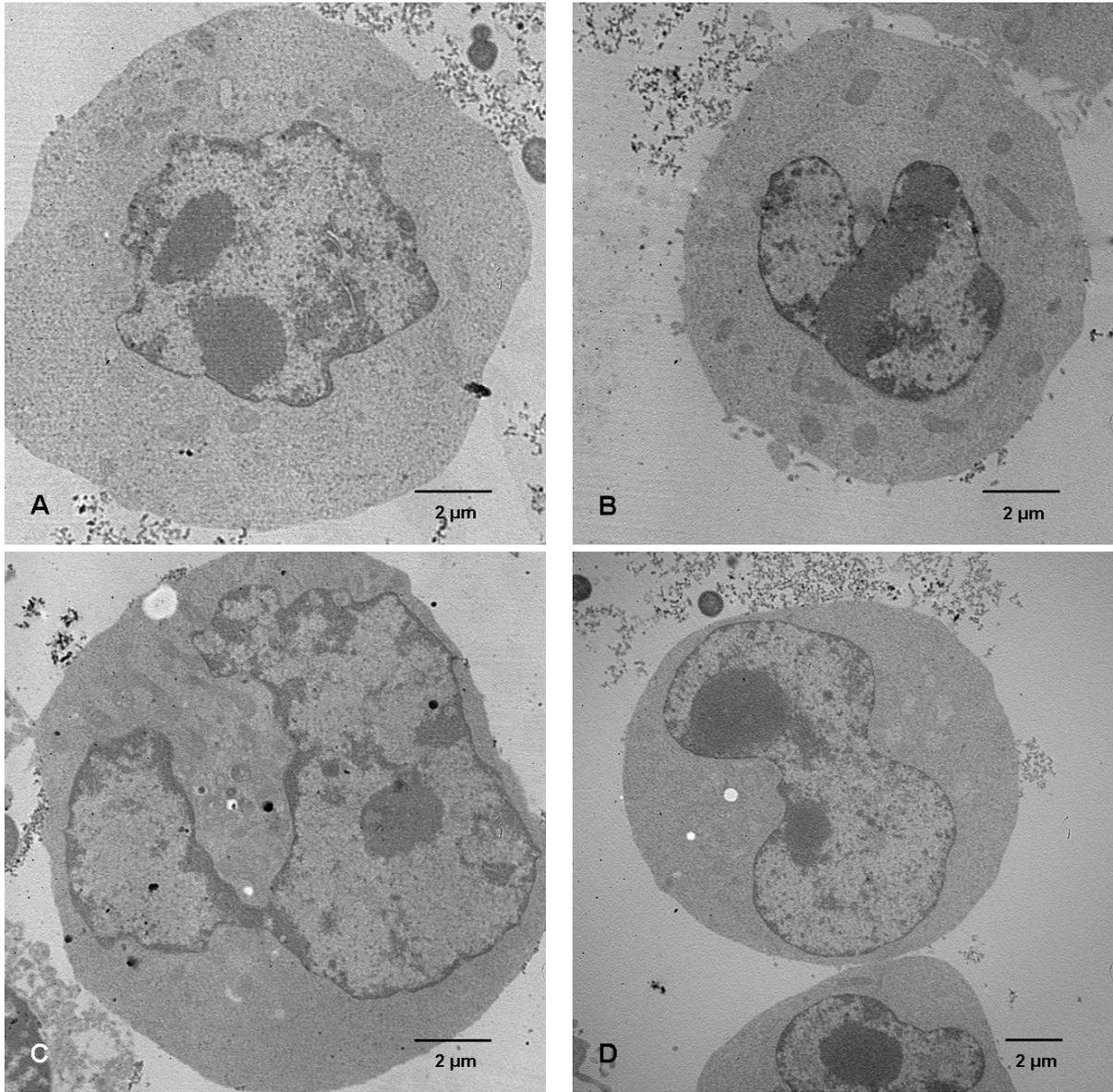


Figura 12. Ultraestructura de granulocitos de *D. coccus* (15 d). **A, B** y **C** granulocitos con organelos en el citoplasma y núcleo lobulado (x10000). **D** granulocito con núcleo lobulado (x7500). Nótese que la cromatina se concentra en la periferia de la membrana nuclear

PLASMATOCITOS

Los plasmatocitos se distinguieron por las irregularidades en la membrana plasmática, observándose prolongaciones como pseudópodos o bien invaginaciones (Figura 13B y 14C), así como por la diversidad de formas, que pueden ser esférica, ovoide o irregular (Figura 13A, 14A y 15A). En el citoplasma se observaron gran número de mitocondrias bien desarrolladas, de tamaño y forma variable, pocas vesículas, RER (Figura 13C, 14C y 15B). La membrana nuclear se observó definida, el núcleo fue central o excéntrico, oval, esférico o lobulado; la cromatina se observó en forma esparcida, pero principalmente se concentró en paquetes en la periferia de la membrana nuclear (Figura 13B, 14B y 15B). Fue posible observar a los plasmatocitos en proceso de fagocitosis (Figura 16A, B y, C). Midieron en promedio $11.88 \pm 1.90 \mu\text{m}$ de ancho y de largo $14.96 \pm 2.15 \mu\text{m}$; el núcleo $5.13 \pm 0.97 \mu\text{m}$ de ancho $6.84 \pm 1.40 \mu\text{m}$ de largo.

Figura 13. Ultraestructura de plasmatocitos de *D. coccus* (15 d). **A** plasmatocitos de forma irregular con núcleo (N) multilobulado (x5000). **B y C** ampliación para observar la irregularidad de la membrana plasmática (MP), así como la presencia de mitocondrias (M) y de vesículas (VE) en el citoplasma (x15000).

Figura 14. Ultraestructura de plasmatocitos de *D. coccus* (15 d). **A** plasmatocitos de forma irregular con núcleos de forma variable (x6000). **B** ampliación de la anterior, nótese la presencia del nucléolo (NU); la cromatina (CM) se concentró en paquetes en la periferia de la membrana nuclear (MN) (x15000). **C** mayor magnificación, distíngase la irregularidad de la membrana plasmática (MP), la presencia en el citoplasma de mitocondrias (M) de gran tamaño y forma variable, RER y ribosomas (R) (x25000).

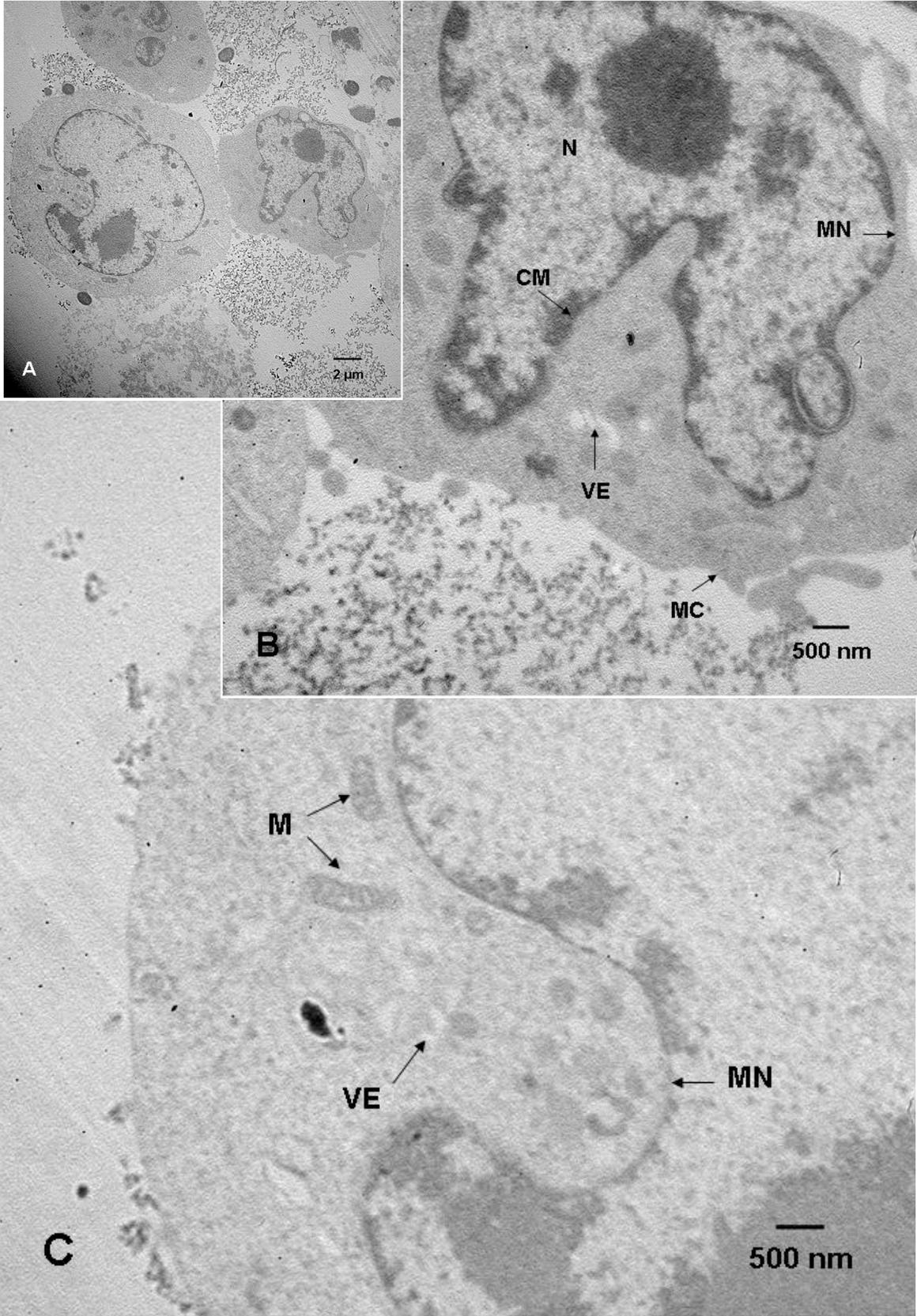


Figura 13

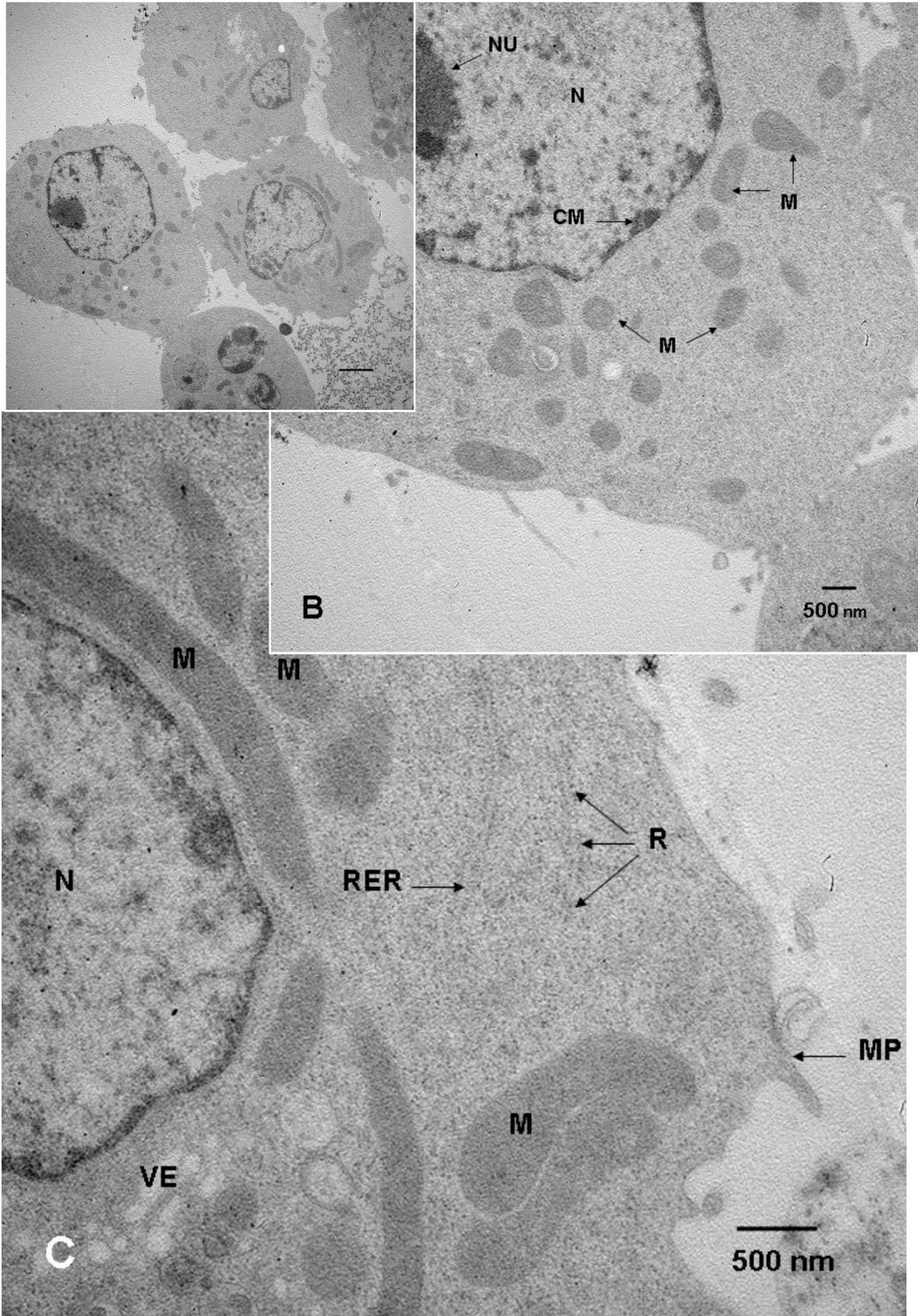


Figura 14

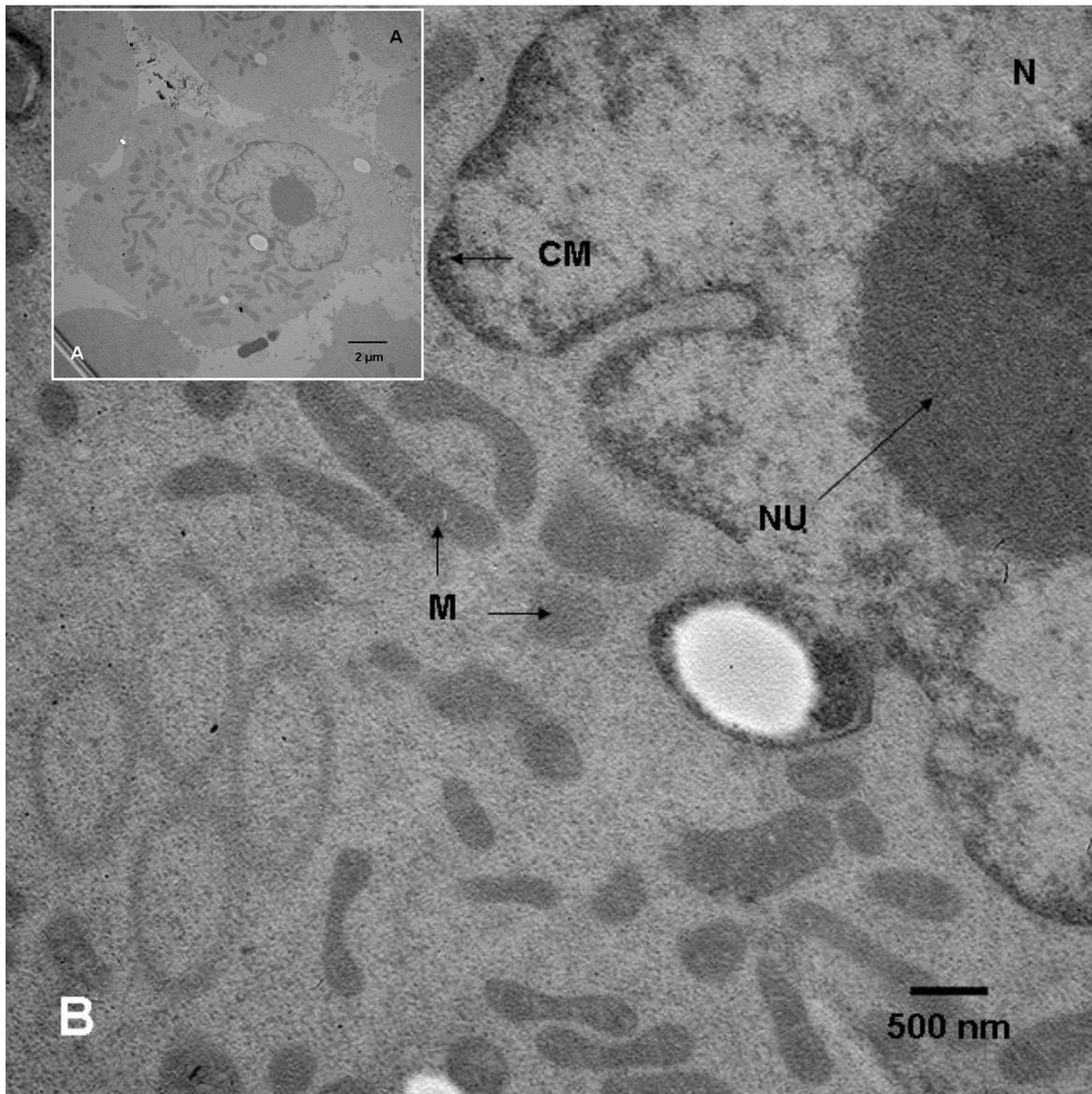


Figura 15. Ultraestructura de un plasmatocito de *D. coccus* (15 d). **A** plasmatocito de forma irregular y núcleo lobulado. **B** ampliación de mismo plasmatocito, nótese la gran cantidad de organelos, principalmente mitocondrias (M) de forma variable y la presencia del nucléolo (NU); la cromatina (CM) agrupada en paquetes cerca de la periferia de la membrana nuclear (MN).

Figura 16. Ultraestructura de plasmatocitos de *D. coccus* (15 d). **A** plasmatocito de forma irregular con núcleo (N) bilobulado (x7500). **B** ampliación del mismo plasmatocito, nótese el proceso de fagocitosis (x12000) **C.** ampliación de la zona, obsérvese la invaginación de la membrana plasmática para englobar el agente extraño (x75000).

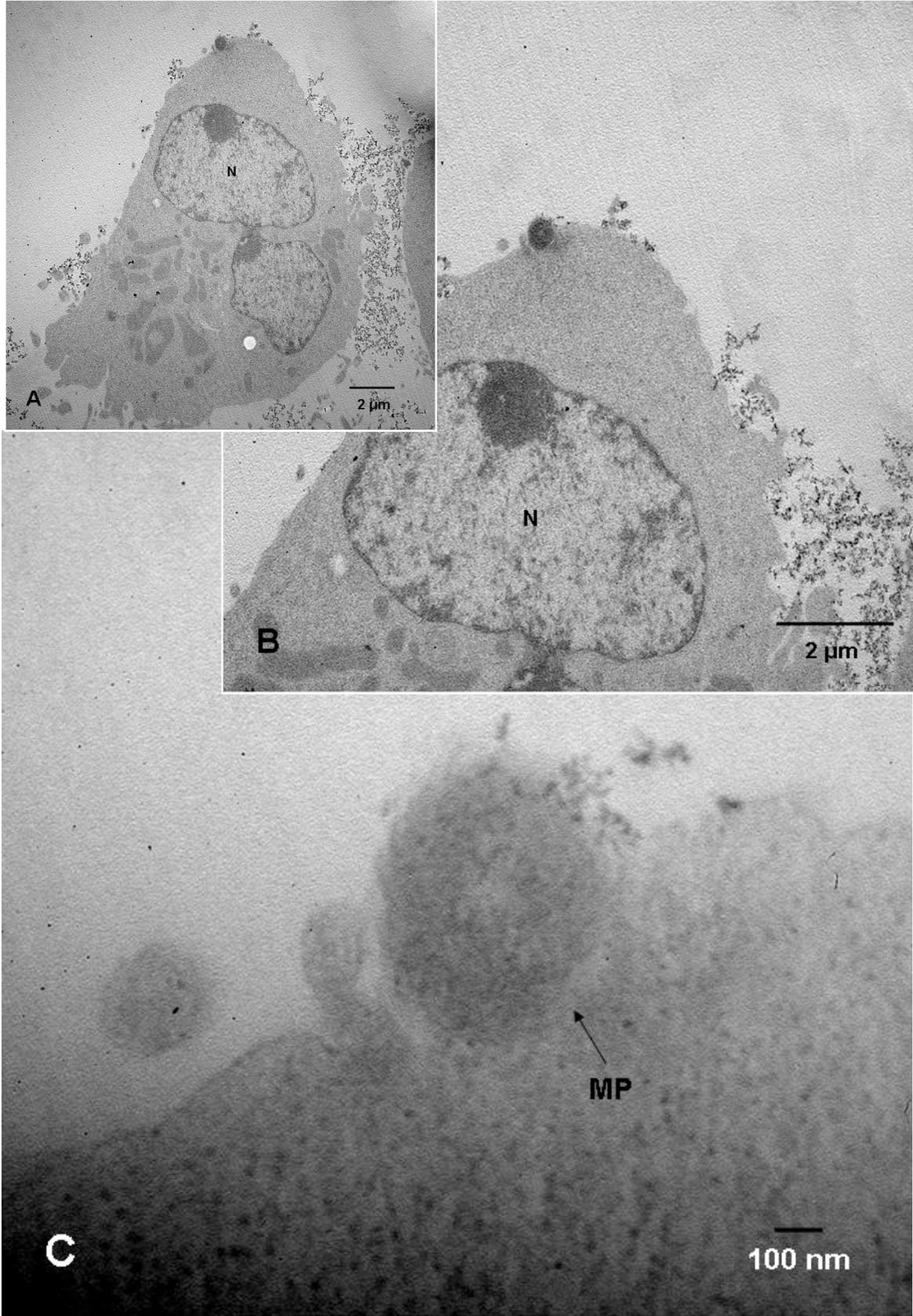


Figura 16

PROHEMOCITOS

Los prohemocitos mostraron ligeras irregularidades en la membrana citoplasmática. Son células extremadamente pequeñas de forma esférica o ligeramente oval. No se observaron organelos en el citoplasma. El núcleo es irregular o esférico, central o excéntrico y ocupa gran parte del citoplasma; la cromatina se observó en la periferia de la membrana nuclear (Figura 17). Midió $4.85 \times 5.25 \mu\text{m}$ y el núcleo $3.74 \times 4.05 \mu\text{m}$.

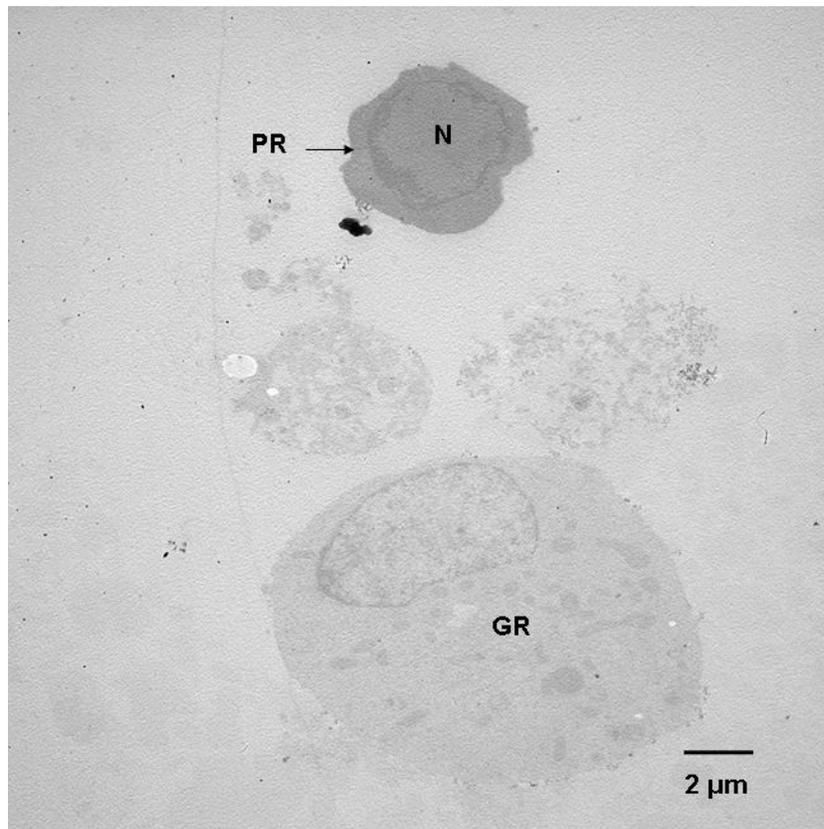


Figura 17. Ultraestructura de un prohemocito (→) de *D. coccus* (15 d), obsérvese la forma irregular, con núcleo esférico que ocupa gran parte del citoplasma, nótese el tamaño pequeño en comparación a otros tipos celulares, como el granulocito (GR) ubicado en la parte inferior (x6000).

OENOCITOIDES

La membrana citoplasmática de estos hemocitos es irregular. Se notaron de forma oval o irregular. El citoplasma fue bastante denso y homogéneo, apenas mostrando vesículas electrodensas. El núcleo fue excéntrico, esférico o alargado, de tamaño variable, ocasionalmente binucleado, con presencia de nucléolo difuso; la cromatina se observó en paquetes en la periferia de la membrana nuclear (Figura 18A, B, C y D). Con esta técnica no fue evidente la presencia de cristales, que es una de las características de los oenocitoides. Midieron aproximadamente de diámetro $6.99 \pm 0.44 \mu\text{m}$ de ancho, $9.24 \pm 1.23 \mu\text{m}$ de largo; el núcleo $2.67 \pm 0.22 \mu\text{m}$ de largo y de ancho $5.32 \pm 1.11 \mu\text{m}$.

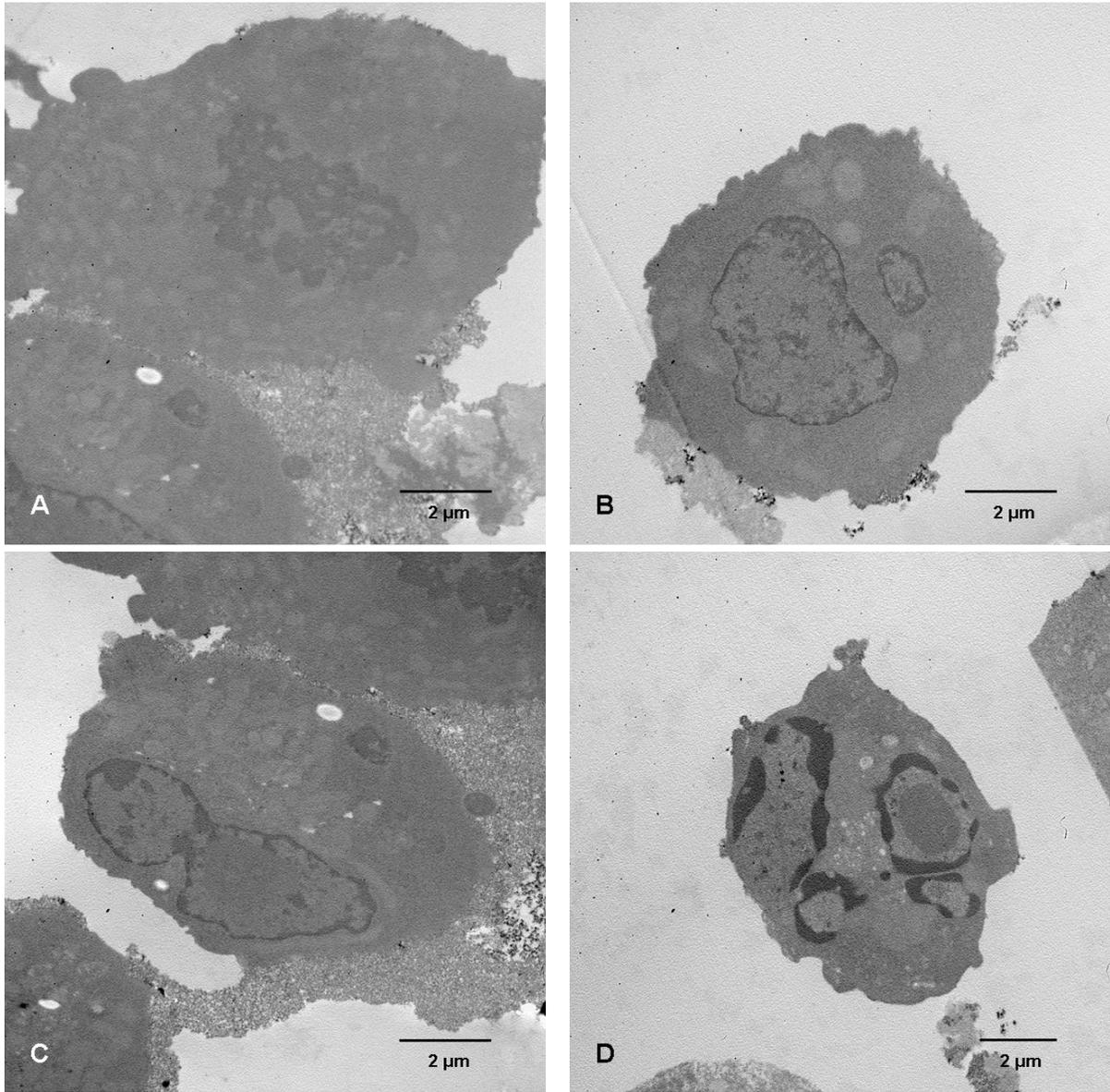


Figura 18. Ultraestructura de oenocitoides de *D. coccus* (15 d). **A, B** y **C** oenocitoides de forma irregular, nótese el citoplasma más electrodenso y núcleo irregular (x12000). **D** oenocitoide de forma irregular, con zonas electrodensas y dispersas de cromatina (x10000).

4.2. Características citoquímicas de *D. coccus*

GRANULOCITOS

Los granulocitos fueron negativos a la técnica para polisacáridos de PAS (Figura 19A y B).

Con Sudán negro la reacción fue ligeramente positiva para la presencia de lípidos, que se nota por la pigmentación oscura tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células (Figura 20A y B).

PLASMATOCITOS

Con la técnica de PAS, los plasmaticos mostraron pequeños gránulos citoplasmáticos positivos a la presencia de polisacáridos (Figura 19C y D).

Con Sudán negro la reacción fue ligeramente positiva para la presencia de lípidos (Figura 21A y B).

Con la técnica de PAS y Sudán Negro B no se observaron los prohemocitos ni los oenocitoides.

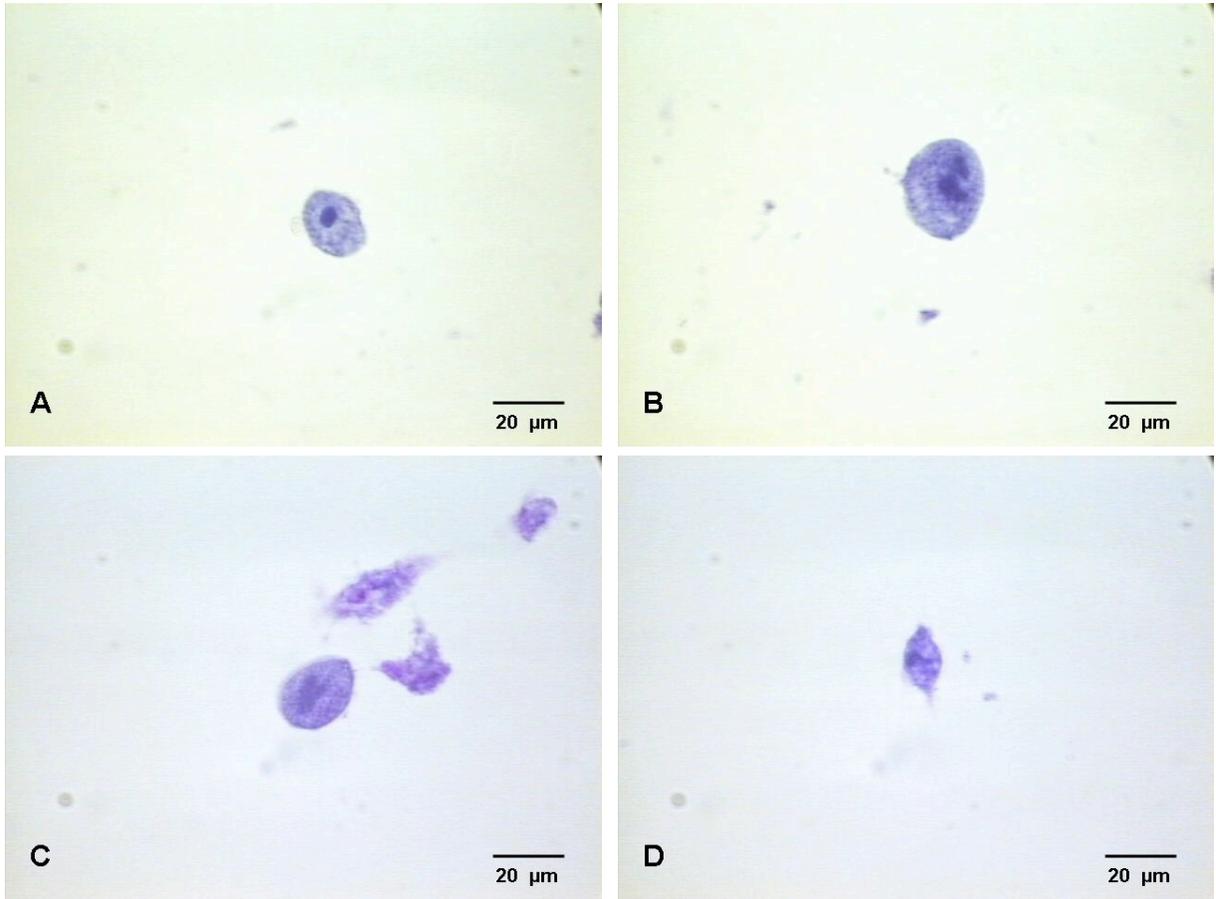


Figura 19. Hemocitos de *D. coccus* con la técnica de PAS (100x). **A** y **B** granulocitos, la reacción fue negativa para polisacáridos. **C** plasmatocitos reactivos a la técnica para polisacáridos.

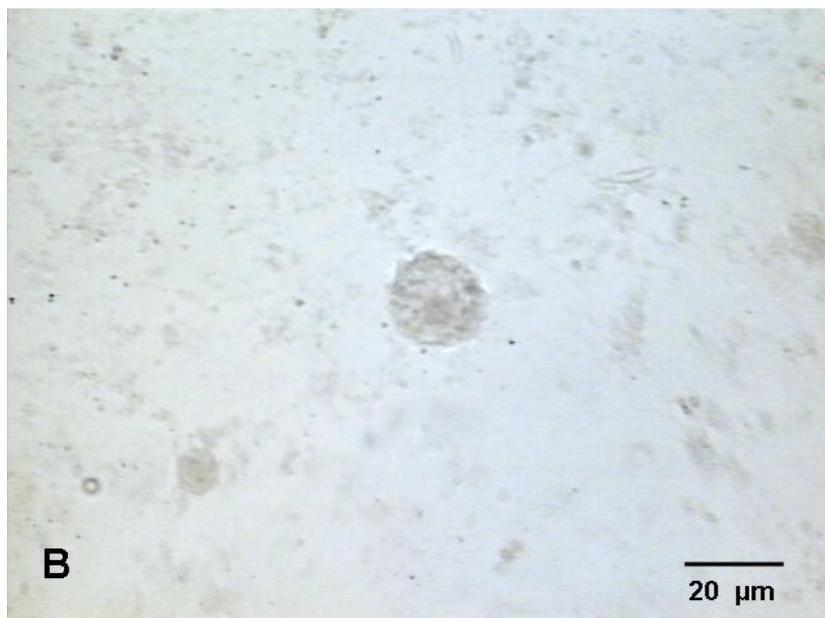
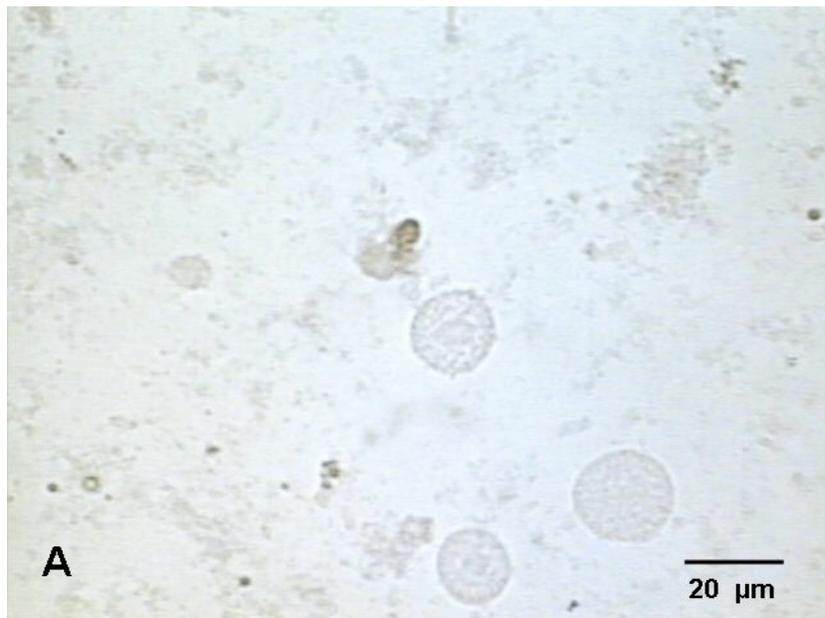


Figura 20. Granulocitos de *D. coccus* con Sudán Negro B (100x). **A** y **B** la reacción positiva para lípidos fue variable en intensidad.

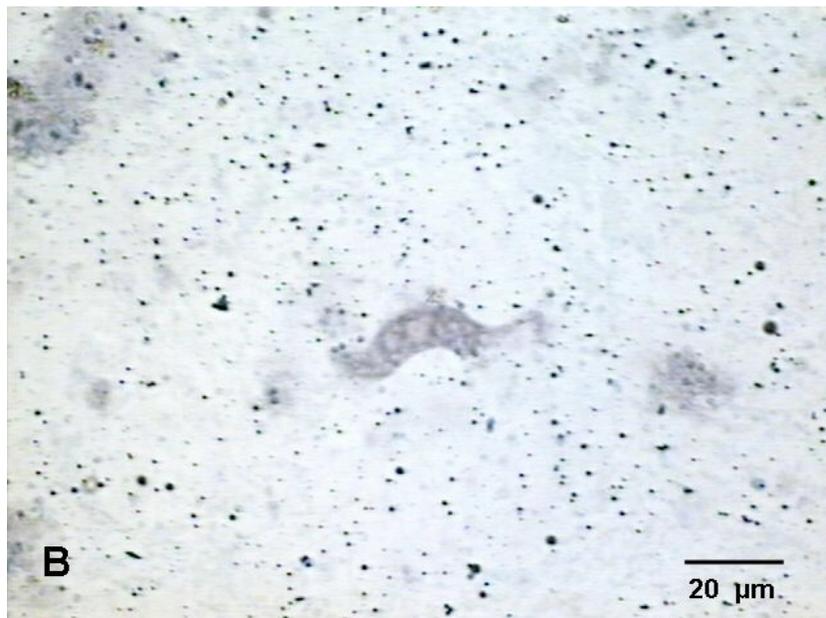
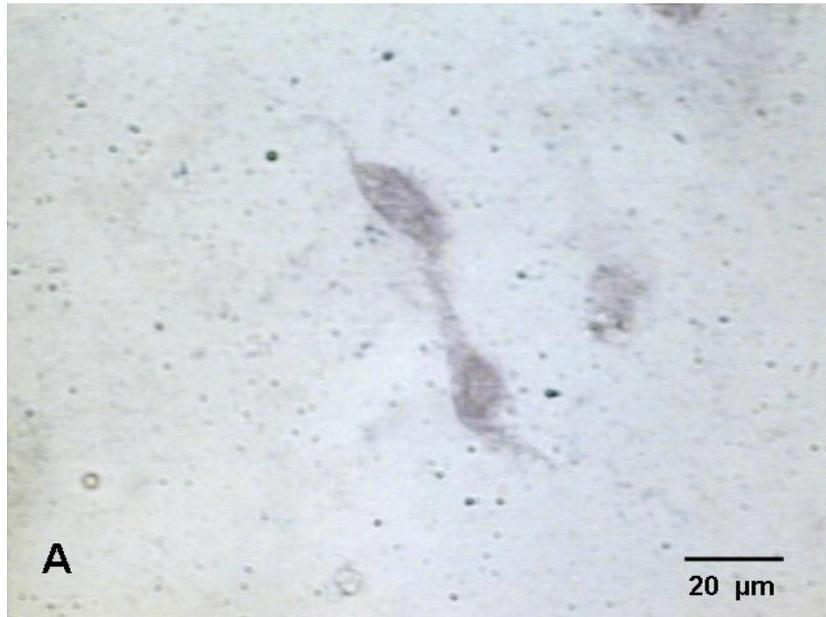


Figura 21. Plasmatocitos de *D. coccus* con Sudán Negro B (100x). **A** y **B** plasmatocitos ligeramente positivos a la prueba para lípidos.

4.3. Variación cuantitativa de los tipos de hemocitos en los diferentes días de vida adulta de *D. coccus*.

Los granulocitos constituyeron el tipo celular más abundante durante el estado adulto de la hembra de *D. coccus*, seguidos por los plasmacitos, mientras que el número de prohemocitos suspendidos en la hemolinfa del insecto en estudio fue escaso. En el porcentaje de granulocitos se observó diferencia significativa en los días uno y diez de vida adulta, en los plasmacitos a los 30 y 50 días, mientras que en los prohemocitos en el día uno y a los 50 días de vida adulta. Se encontró un porcentaje muy bajo de células no identificadas o en proceso de degeneración (Cuadro 4).

Cuadro 4. Cuenta diferencial de los hemocitos de hembras de *D. coccus*.

Días de vida adulta	Tipos celulares (%)							
	GR		PL		PR		Ni	No. t C
1	70.87	bcde*	21.35	ab	4.80	e	0.29	1030
10	80.76	de	18.26	a	0.96	a	0	1040
20	65.13	abcd	32.11	abc	1.83	abc	0.92	1090
30	51.48	ab	46.53	de	0.99	ab	0	1010
40	61.61	abc	33.64	abcd	1.86	abcd	0.28	1070
50	51.37	a	42.20	cde	3.67	cde	0.28	1090

GR granulocitos, **PL** plasmacitos, **PR** prohemocitos, **Ni** células no identificadas, **No. t C** número total de células

*Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Prueba de Tukey, ≤ 0.05).

4.4. Población de granulocitos suspendidos en la hemolinfa de *D. coccus* durante el estado adulto de la hembra.

La variación observada en la población de granulocitos fue en el tamaño de la célula y en la forma del núcleo. La gran mayoría de los granulocitos encontrados en la hembra de un día de vida adulta fueron de tamaño mediano y sin cambios en el núcleo (Figura 22); en la población de granulocitos de hembras de diez a cincuenta días, en general hubo un aumento progresivo tanto en tamaño como en abundancia y una transformación gradual de la forma del núcleo, ya que se observó fragmentación de éste (Cuadro 5 y 6; Figura 23 a 27). En la población de granulocitos existen diferencias significativas en el área celular a los 40 y 50 días de vida adulta de *D. coccus* (Cuadro 7).

Cuadro 5. Porcentaje de granulocitos en de hembras de *D. coccus*.

	DÍAS DE VIDA ADULTA					
Tamaño	1	10	20	30	40	50
Máx	8.22	28.57	40.84	38.46	59.70	75.0
Med	76.68	59.52	47.88	44.23	28.35	17.86
Min	15.06	11.90	11.27	17.30	11.94	7.14

Cuadro 6. Análisis morfométrico de la población de granulocitos en la hembra adulta de *D. coccus*.

AREA (μm^2)	1	10	20	30	40	50
AC	105.39±47.09	151.09 ±129.49	183.53±117.34	196.26±180.42	338.01± 213.1	550.93± 279.65
ACMáx	203.09	508.21	391.64	611.4	808.36	974.84
ACMin	41.86	11.9	22.2	25.31	59.95	42.02
AN	16.14± 6.29	27± 22.61	23.54±15.64	29.65± 24.55	51.33± 30.53	49.40± 23.88
ACi	89.25±41.28	123.71±107.89	159.99±103.23	166.61±156.99	286.67±184.58	430.87±210.86

AC área celular, **ACMáx** área celular máxima, **ACMin** área celular mínima, **AN** área nuclear, **AC** área citoplasma

Cuadro 7. Promedios del área celular de la población de granulocitos de *D. coccus*

Días de vida adulta	Medias AC (μm^2)	
1	105.39	a *
10	151.10	ab
20	183.54	abc
30	196.26	abcd
40	338.01	cde
50	550.93	e

Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Prueba de Tukey, ≤ 0.05).

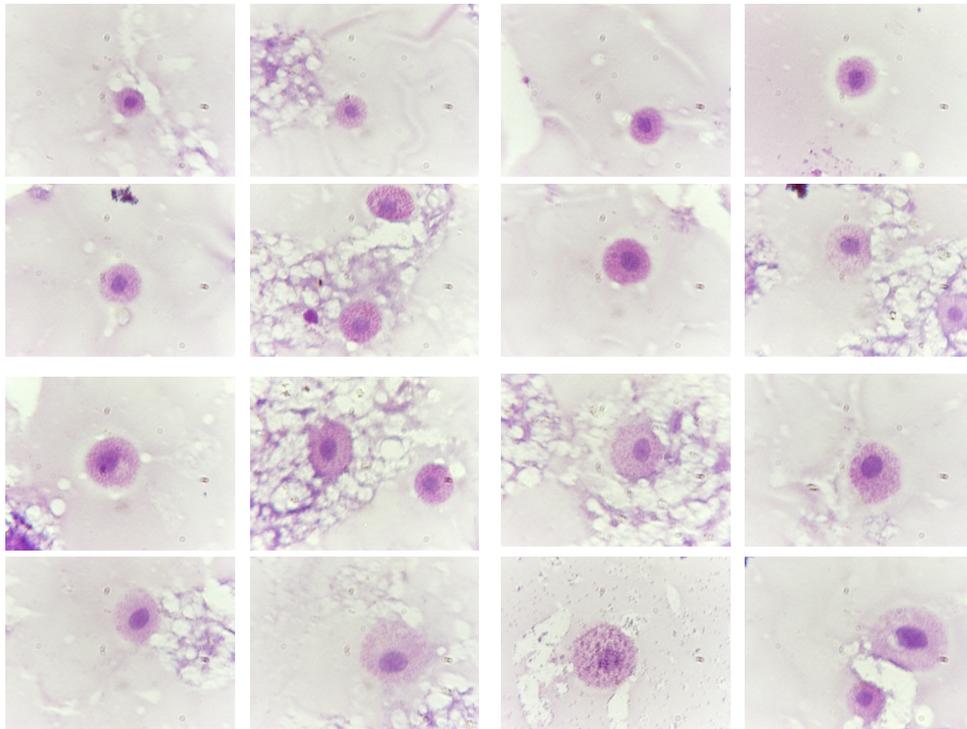


Figura 22. Población de granulocitos de *D. coccus* en hembras de un día de vida adulta.

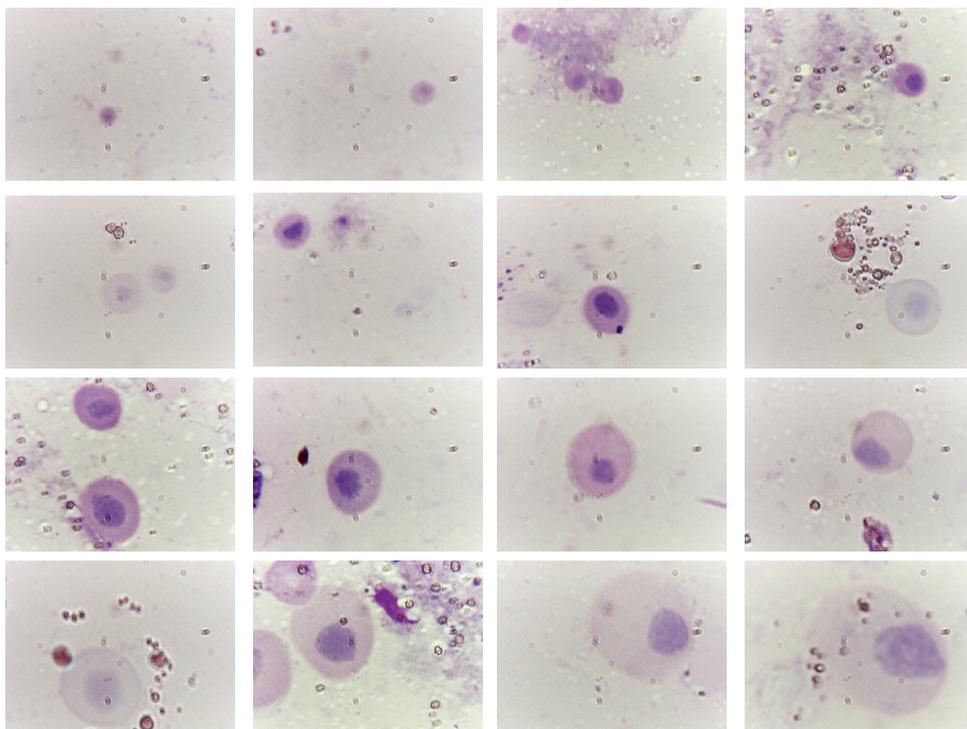


Figura 23. Población de granulocitos de *D. coccus* en hembras de diez de vida adulta.

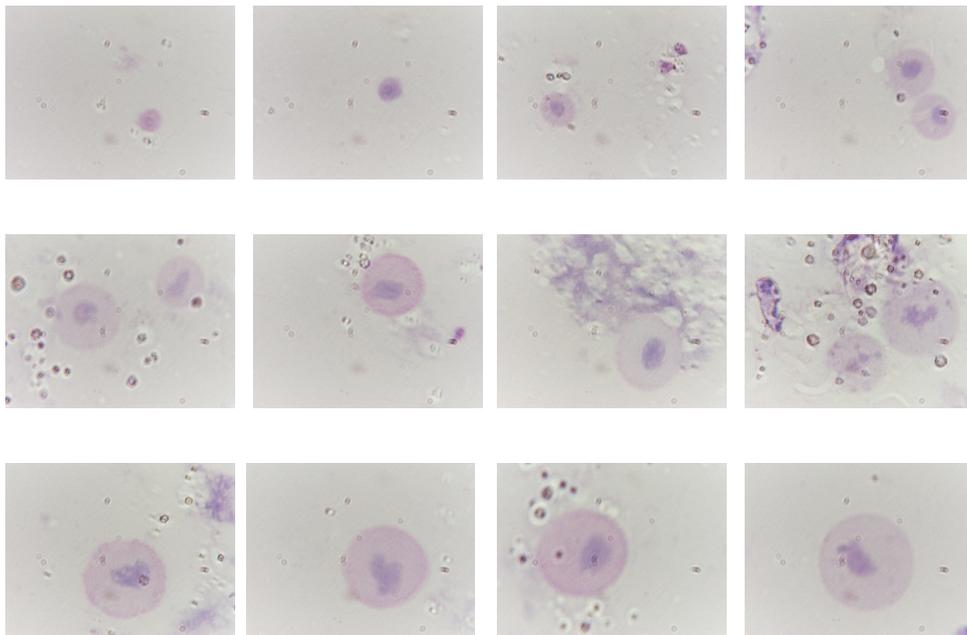


Figura 24. Población de granulocitos de *D. coccus* en hembras de veinte días de vida adulta.

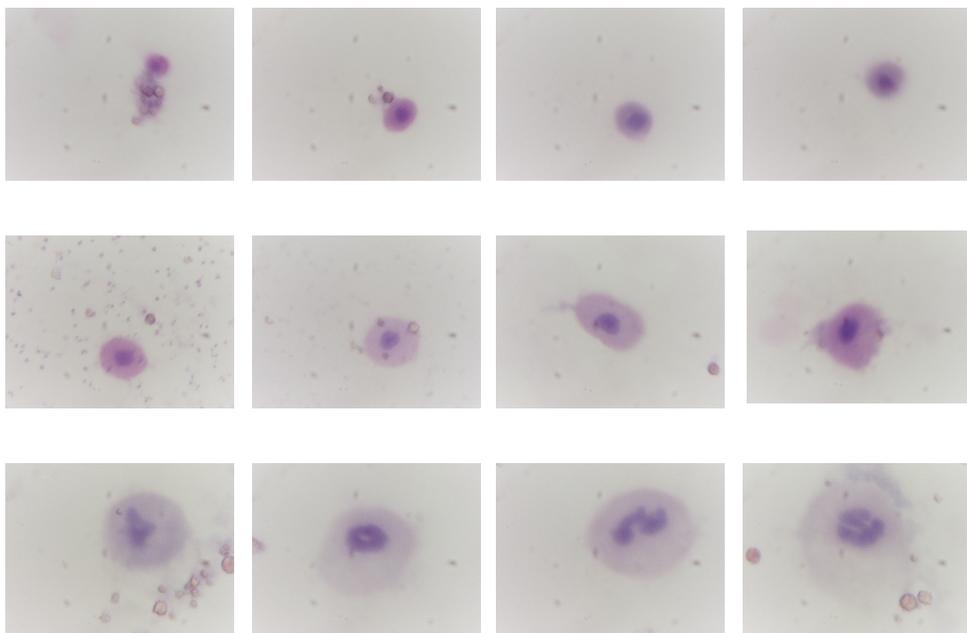


Figura 25. Población de granulocitos de *D. coccus* en hembras de treinta días de vida adulta.

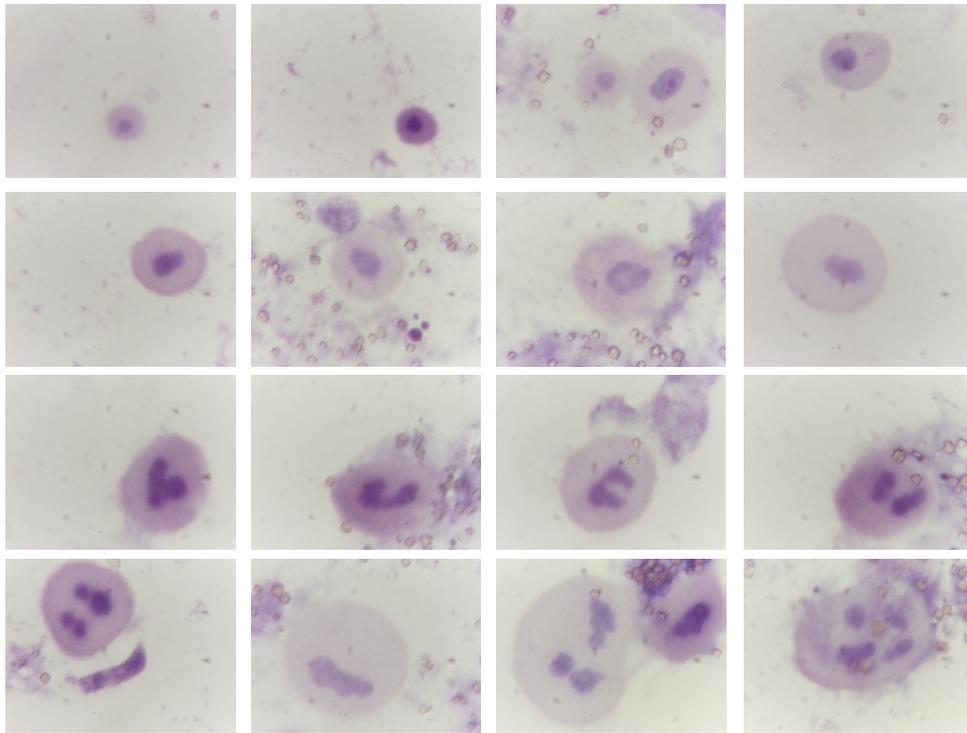


Figura 26. Población de granulocitos de *D. coccus* en hembras de cuarenta días de vida adulta.

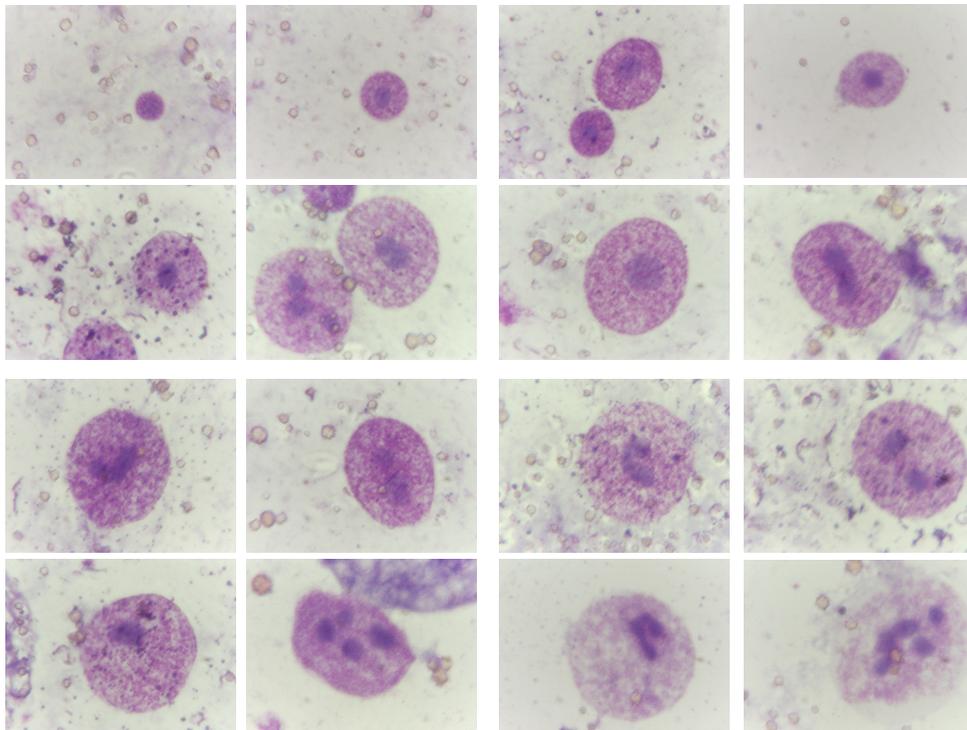


Figura 27. Población de granulocitos de *D. coccus* en hembras de cincuenta días de vida adulta.

5. DISCUSIÓN

La gran mayoría de trabajos relacionados con los tipos de hemocitos se han realizado principalmente en lepidópteros y dípteros; en cuanto a hemípteros, los más estudiados han sido los triatominos debido a su importancia como vectores de enfermedades y poco se ha estudiado a los dactilópodos.

Azambuja *et al.* (1991) en *Rhodnius prolixus*, *R. neglectus*, *R. robustus*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* y *Dipetalogaster maximus*, con MCF identificaron prohemocitos, plasmaticos, granulocitos, oenocitoides, adipohemocitos, cistocitos y células gigantes. Berber (2007) observó en *Triatoma longipennis* los primeros cinco tipos de hemocitos citados anteriormente, utilizando Giemsa y May-Grünwald, MCF y citoquímicas.

Russo *et al.* (1993) determinaron con MET en *Phenacoccus manihoti* prohemocitos, oenocitoides y granulocitos tipo 1, 2 y 3, clasificación que establecieron de acuerdo a la forma de la célula, la disposición y el contenido de organelos, así como a su respuesta química; en *Planococcus citri* sólo se observaron granulocitos tipo 2 y 3.

Los granulocitos, plasmaticos, prohemocitos y oenocitoides encontrados en este estudio para *D. coccus* son los mismos tipos de hemocitos que Joshi y Lambdin (1996) determinaron en *D. confusus* con MET y ML (técnica de PAS), aunque estos autores subdividieron a los granulocitos en típicos y modificados por el desarrollo de los gránulos citoplasmáticos y RER, así como por la presencia del REL. Estos autores sugieren que el granulocito modificado puede estar involucrado en la síntesis de ácido carmínico, aunque no continuaron la investigación con las pruebas bioquímicas para corroborar tal afirmación.

En varias especies de insectos se ha comprobado que los granulocitos intervienen en el transporte de nutrientes, son precursores de otros tipos de hemocitos y participan en procesos de respuesta inmune durante los cuales descargan su contenido granular sobre o alrededor de organismos extraños que invaden el hemocelo (Gillispie *et al.*, 1997; Lavine y Strand, 2002; Nation, 2002).

En *D. coccus* la variación observada en los granulocitos fue con relación al tamaño, así como por las características del núcleo, pues el tipo de granulaciones fue constante y la presencia de organelos como RER, ribosomas, mitocondrias y vesículas fue abundante. Lackie (1988) señala que la morfología puede estar relacionada con el estado de activación o madurez de la célula.

Los plasmaticos se consideran formas de transición entre los prohemocitos y los granulocitos (Gupta, 1985; Nation, 2002) y están involucrados en funciones de fagocitosis, nodulación y restauración de heridas (Barraco y Loch, 1991; Chapman, 1998).

La variabilidad cuanto a forma, extensiones citoplasmáticas, así como la gran cantidad de organelos, características observadas en los plasmaticos de *D. coccus* coinciden con las reportadas para este tipo de hemocitos por Joshi y Lambdin (1996) en *D. confusus*. Los plasmaticos y en menor cantidad los granulocitos se observaron en proceso de fagocitosis (Figura 16), este fenómeno concuerda por lo reportado por Ratcliffe y Rowley (1979) y Gupta (1985).

La escasa presencia de oenocitoides en *D. coccus* contrasta con el estudio de Joshi y Lambdin (1996), quienes encontraron que en *D. confusus* éste fue el segundo tipo en abundancia y la célula más grande. Con MCF se observó un cristal en estas células, pero no con MET; al respecto, Chapman (1998) menciona que no siempre

están presentes este tipo de inclusiones, y por su parte, Joshi y Lambdin (1996) sugieren que los oenocitoides descargan los cristales en la hemolinfa, aunque no proporcionan evidencia para tal afirmación.

En los granulocitos, plasmacitos y oenocitoides de *D. coccus* se observaron dos o más núcleos formando grandes paquetes de cromatina, proceso que Arnold (1974) describe como amitosis y que consiste en una fragmentación nuclear que origina hemocitos binucleados o multinucleados, condición que fue evidente en los granulocitos y que se acrecentó conforme aumentaba la edad de la hembra de *D. coccus*, a la vez que había un incremento gradual en el tamaño del granulocito y por consiguiente una desintegración o proceso de degeneración celular.

Los prohemocitos, el tipo celular más pequeño, fue también el de menor incidencia en *D. coccus*, lo cual coincide con lo reportado por Chapman (1998) que señala que los prohemocitos son precursores de otros tipos de hemocitos y se obtienen en poca cantidad de las muestras de hemolinfa debido a que no se encuentran en circulación, sino adheridos a algunos órganos; además, Gupta (1985) y Joshi y Lambdin (1996) señalan que su número declina a medida que avanza el estado de desarrollo, por lo que son más escasos en adultos que en inmaduros. En este estudio no se observaron en proceso de mitosis, debido probablemente a que el estudio se realizó en el estado adulto.

En *D. coccus*, Aquino *et al.* (2002) en preparaciones de hemolinfa en fresco y teñidas con acetorceína, identificaron prohemocitos, oenocitoides, plasmacitos y granulocitos, además de reportar a los “cromatocitos” como otro tipo de hemocito, a los que definieron como variables en forma, con núcleos incoloros y citoplasma con vesículas que contienen una estructura de color carmín, pero en esta investigación

no se observaron células con tales características. En general hay diferencias en cuanto a la descripción que hacen de las células con lo reportado en este trabajo, además de que no se encontró coincidencia en la abundancia de tipos distintos, ya que dichos autores mencionan que del total de hemocitos, 62% fueron cromatocitos y del resto, más de la mitad se identificaron como prohemocitos, que en el caso de este estudio fueron bastantes escasos.

Con MCF además de los cuatro tipos celulares mencionados, en la hemolinfa de *D. coccus*, se observaron corpúsculos de ácido carmínico identificados por su coloración rojiza y su refringencia, los cuales son más pequeños que cualquiera de los hemocitos descritos. Los corpúsculos en ocasiones se agrupan alrededor de un hemocito, dando la apariencia de ser una célula más (Figura 8). Probablemente a este tipo de aglomeraciones es al que Aquino *et al.* (2002) llamaron cromatocito, al cual le atribuyeron funciones de síntesis y almacenamiento de ácido carmínico.

La reacción positiva a PAS de los granulocitos y los plasmacitos demuestra la presencia de polisacáridos en ellos; las granulaciones en estos hemocitos se observaron distribuidas uniformemente en todo el citoplasma, las cuales de acuerdo con Arnold (1974) y Nation (2002) son inclusiones citoplasmáticas de mucopolisacáridos y glicoproteínas. Ashhurst (1979) y Gupta (1985) mencionan que los plasmacitos y granulocitos intervienen en la formación de tejido conectivo, al participar en la síntesis y secreción de glicoproteínas y mucopolisacáridos.

Los resultados obtenidos con la prueba de Sudán Negro B, indican que los granulocitos y plasmacitos de *D. coccus* fueron ligeramente positivos a lípidos; Gupta (1985) señala que estos hemocitos participan en la síntesis y almacenamiento de lipoproteínas.

Con la tinción de Giemsa y May-Grünwald, PAS y Sudán Negro B, no se observaron los oenocitoides. Gupta (1985) menciona que estos hemocitos son de una naturaleza altamente lábil y que *in vitro* son particularmente frágiles y se lisan rápidamente; además Hillyer *et al.* (2003) señala que tienen una capacidad limitada para adherirse al vidrio. Las funciones de este tipo de hemocito no están bien definidas como en el caso de los anteriores.

El hecho de que en la cuenta diferencial de hemocitos los granulocitos fueran las células más abundantes en circulación y de tamaño variable, se ha reportado frecuentemente en granulocitos de otros insectos como *Phenacoccus manihoti* y *Planococcus citri* (Russo *et al.*, 1994) así como en *Rhodnius prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* y *Dipetalogaster maximus* (Azambuja *et al.*, 1991).

La morfología constante de los prohemocitos durante el estado adulto de las hembras de *D. coccus*, coincide con la reportada en los prohemocitos de *D. confusus* por Joshi y Lambdin (1996) y en otros insectos como *P. manihoti* (Russo *et al.*, 1994).

En general las características observadas para los plasmátocitos, prohemocitos y oenocitoides de *D. confusus* por Joshi y Lambdin (1996) son similares con las características citológicas encontradas en *D. coccus*. También hay coincidencia con estos autores en la abundancia de granulocitos y la escasez de prohemocitos, pero no en la abundancia de oenocitoides.

6. CONCLUSIONES

Los tipos de hemocitos caracterizados en *D. coccus* fueron: granulocitos, plasmaticos, prohemocitos y oenocitoides.

En los granulocitos y los plasmaticos se apreció la forma de la membrana plasmática y se observaron definidos los organelos.

Los granulocitos, plasmaticos y oenocitoides en ocasiones se observaron con dos o más núcleos.

Los plasmaticos y granulocitos se observaron en proceso de fagocitosis.

Los granulocitos y plasmaticos fueron ligeramente positivos al reactivo de PAS para polisacáridos y a Sudán Negro B para lípidos.

Los granulocitos fueron el tipo celular más abundante durante el estado adulto de la hembra, los plasmaticos fue la población intermedia y tanto los prohemocitos como los oenocitoides fueron escasos.

Durante vida adulta de la hembra, se observó diferencia significativa en el porcentaje de granulocitos en los días uno y diez, en los plasmaticos a los 30 y 50 días y en los prohemocitos en los días uno y 50 días.

En la población de granulocitos en las hembras de 10 a 50 días de vida adulta, se observó un aumento progresivo en el tamaño celular, en la cantidad y en la forma del núcleo; el área celular mostró diferencias significativas a los 40 y 50 días de vida adulta.

Las distintas técnicas de microscopía y citoquímicas se complementan para la caracterización de los distintos tipos de hemocitos de *D. coccus*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aldama-Aguilera, C., y C. Llanderal-Cázares. 2003. Grana cochinilla: comparación de métodos de producción en penca cortada. *Agrociencia* 37: 11-19.
- Allewi, P. M. Anastasia, S. Bingham, P. Ciuffreda, A. Fiecchi, G. Cighetti, M. Muir, A. Scala and J. Tyman. 1998. Synthesis of carminic acid, the colourant principle of cochineal. *J. Chem. Soc Perkin Trans. 1*: 575-582.
- Aquino P., G., N. M. Bárcenas C., y J. Valdez C. 2002. Avances en la citología de la cochinilla del nopal en condiciones *in vivo e in vitro* y su biología reproductiva. *In: Memoria del II Congreso Internacional de Grana Cochinilla y Colorantes Naturales y II Reunión Internacional del Grupo de Trabajo en Cochinilla, Cactusnet-FAO. Portillo L., M., y A. L. Viguera G. (eds). Universidad de Guadalajara, México. pp: 3-35.*
- Arnold, J. W. 1974. The hemocytes of insects. *In: The Physiology of Insecta. Rockstein, M. (ed). 2a. Ed. Academic Press, New York. pp: 201-254.*
- Arnold, J. W. 1979. Controversies about hemocyte types in insects. *In: Insect Hemocytes Development, Forms, Functions, and Techniques. Gupta, A. P. (ed). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 231-258.*
- Arnold, J. W. and C. F. Hinks. 1979. Insect hemocytes under light microscopy: techniques. *In: Insect Hemocytes Development, Forms, Functions, and Techniques. Gupta, A. P. (ed). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 531-538.*
- Ashurst, D. E. 1979. Histochemical methods for hemocytes. *In: Insect Hemocytes Development, Forms, Functions, and Techniques. Gupta, A. P. (ed). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 581-599.*
- Azambuja, P. de, E. S. García, and N. A. Ratcliffe. 1991. Aspects of classification of hemiptera hemocytes from six triatomine species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 86: 1-10.*

- Baerwald, R. J. 1979. Light, transmission, and scanning electron microscopic techniques for insects hemocytes. *In*: Insect Hemocytes Development, Forms, Functions, and Techniques. Gupta, A. P. (ed). Cambridge University Press. Cambridge. 563-580.
- Barracco, M. A., and C. T. Loch. 1991. Cellular and molecular aspects of insect immunity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro.* 86: 23-24.
- Berber Villamar, N. K. 2006. Estudio sobre los hemocitos de *Triatoma longipennis* (Hemiptera: Triatominae). Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. 56 p.
- Brown, K. S. 1975. The chemistry of aphids and scale insects. *Chem. Soc. Rev.* 4:263-288.
- Campos-Figueroa, M., y C. Llanderal-Cázares. 2003. Producción de grana cochinilla *Dactylopius coccus* (Homoptera: Dactylopiidae) en invernadero. *Agrociencia* 37: 149-155.
- Chapman, R. F. 1998. *The Insects Structure and Function.* Cambridge University Press. United Kingdom. pp: 94-127.
- De Haro M. E. y L. E. Claps. 1995. Conociendo nuestra fauna III: Familia Dactylopiidae (Insecta: Homoptera): Morfología, biología e importancia económica. Instituto Superior de Entomología INSUE. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Universidad Nacional de Tucumán. Serie Monográfica y Didáctica No. 19. 20 p
- Eisner, T.; S. Nowicki; M. Goetz; and J. J. Meinwald. 1980. Red cochineal dye (carminic acid): its role in nature. *Science* 208: 1039-1042.
- Estrada F., E., L. Peralta Z., y P. Rivas M. 1982. *Manual de Técnicas Histológicas.* AGT Editor S.A., México. 140 p.
- Favaro G., C. Miliani, A. Romani, and M. Vagnini. 2002. Role of protolytic interactions in photo-aging processes of carminic acid and carminic lake solution and painted layers. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2:* 192-197.

- Feir, D. 1979. Multiplication of hemocytes. *In: Insect Hemocytes Development, Forms, Functions, and Techniques*. Gupta, A. P. (ed). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 67-82.
- García, F., H. Lanz, A. Rojas, y F. Hernández. 2002. Efecto de inhibidores de la síntesis de prostaglandinas en la coagulación del homóptero *Dactylopius coccus* (cochinilla del nopal). *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*. pp. 15-19.
- Gillespie, J. P., M. R. Kanost, and T. Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 611-643.
- González, L., M. Alba, F. García-Gil, H. Lanz, A. Rojas, I. del Río and F. Hernández-Hernández. 2002. Evaluation of the clotting response of the hemolymph of cochineal (*Dactylopius* sp.) and its predator (*Laetilia coccidivora*). *Society for Invertebrate Pathology. XXXIII Annual Meeting*. Guanajuato, México. Abstracts p. 47.
- Gupta, A. P. 1979. Hemocyte types: their structures, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance. *In: Insect Hemocytes Development, Forms, Functions, and Techniques*. Gupta, A. P. (ed). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 85-127.
- Gupta, A. P. 1985. Cellular elements in the hemolymph. *In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut, G. A., and L. I. Gilbert (eds). Pergamon, Press Oxford. pp: 401-451.
- Harborne, J. B. 1988. *Introduction to Ecological Biochemistry*. Third Edition. Academia Press. Great Britain. 356 p.
- Hernández-Hernández, F. de la C., F. García-Gil de M., A. Rojas-Mártinez, S. Hernández-Martínez, and H. Lanz-Mendoza. 2003. Carminic acid dye from the Homopteran *Dactylopius coccus* hemolymph is consumed during treatment with different microbial elicitors. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54:37-45.
- Hernández-Hernández, F. de la C., F. García G. de M., I. del Río D., y H. Lanz M. 2005. La cochinilla fina del nopal, colorante mexicano para el mundo. *Ciencia* 56: 78-86.

- Hillyer, J. F.; S. L. Schmidt, and B. M. Christensen. 2003. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. *Cell Tissue Res.* pp.1-20.
- Horn, D. J. 1978. *Biology of insects.* W. B. Saunders Company. 400 p.
- Hoffmann, J. A., D. Zachary, D. Hoffmann, M. Brehélin, and A. Porte. 1979. Postembryonic development and differentiation: hemopoietic tissues and their functions in some insects. *In: Insect Hemocytes Development, Forms, Functions, and Techniques.* Gupta, A. P. (ed). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 29-66.
- Jalón M., F. Peña M. and J. Rivas C. 1989. Liquid chromatographic determination of carminic acid in yogurth. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72(2): 231-233.
- Joshi, P. A., and P. L. Lambdin. 1996. The ultrastructure of hemocytes in *Dactylopius confusus* (Cockerell), and the role of granulocytes in the synthesis of cochineal dye. *Protoplasma* 192: 199-216.
- Jones, J. C. 1979. Pathways and pitfalls in the classification and study of insect hemocytes. *In: Insect Hemocytes Development, Forms, Functions, and Techniques.* Gupta, A. P. (ed). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 279-300.
- Lackie, A. M. 1988. Haemocyte behaviour. *Adv. Insect Physiol.* 21: 85-178.
- Lambdin, P. L., G. P. Aquino, J. F. Green, and M. Soto-Hernández. 2002. Synopsis of carmine acid biosynthesis. *Cactusnet.* Issue No. 7. pp. 11-15.
- Lavine, M. D., and M. R. Strand. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1295-1309.
- Llanderal C., C., y R. Nieto H. 2001. Características biológicas de la grana cochinilla del nopal (*Dactylopius coccus* Costa). *In: Producción de Grana Cochinilla.* Llanderal C., C., y R. Nieto H. (eds). México. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. pp: 23-30.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2004. *Brock. Biología de los microorganismos.* Decima edición. Pearson Educación, S. A. Madrid 1096 p.

- Maza B. L. 1999. Aspectos biológicos de la grana cochinilla del nopal (*Dactylopius coccus* Costa) y métodos de infestación. Memoria Residencia Profesional. Instituto Tecnológico Agropécuario 29. 27 p.
- Mora I., A. 1996. Extracto rojo de cochinilla: estudio de las condiciones de extracción y su importancia como colorante natural. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 47 p.
- Mori, H. 1979. Embryonic hemocytes: origin and development. *In: Insect Hemocytes Development, Forms, Functions, and Techniques*. Gupta, A. P. (ed). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 3-28.
- Nation, J. L. 2002. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press. Florida. 485 p.
- Panadero S., A. Gómez-Hens and D. Pérez-Bendito. 1997. Kinetic determination of carminic acid by its inhibition of lanthanide-sensitized luminescence. *Fresenius J. Anal. Chem.* 357: 80-83.
- Paskewitz, S. M., and M. J. Gorman. 1999. The global status of malaria. *American Entomologist* 45: 81-94.
- Ratcliffe, N. A. and A. F. Rowley. 1979. Role of hemocytes in defense against biological agents. *In: Insect Hemocytes Development, Forms, Functions, and Techniques*. Gupta, A. P. (ed). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 231-414.
- Rodríguez, L. C., E. Faúndez, J. Seymour, C. A. Escobar, L. Espinoza, M. Petroutsa, A. Ayres y H. M. Niemeyer. 2005. Factores bióticos y concentración de ácido carmínico en la cochinilla (*Dactylopius coccus* COSTA) (Homoptera: Dactylopiidae). *Agricultura Técnica (Chile)* 65(3): 323-329.
- Ross, M. H., G. I. Kaye, and W. Pawlina. 2005. *Histología texto y atlas color con Biología Molecular*. 4^a Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina. 864 p.
- Russo, J., M. R. Allo, J. P. Nenon, and M. Brehélin. 1993. The hemocytes of the mealybugs *Phenacoccus manihoti* and *Planococcus citri* (Insecta:Homoptera) and role in capsule formation. *Can. J. Zool.* 72:252-258.

- Shapiro, M. 1979. Hemocyte techniques: advantages and disadvantages. *In: Insect Hemocytes Development, Forms, Functions, and Techniques*. Gupta, A. P. (ed). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 549-562.
- Sheehan, D. C., y B. B. Hrapchak. 1980. Theory and Practice of Histotechnology. The C. V. Mosby Company. 2nd Ed. St. Louis Missouri. pp. 292-309.
- Stanley, D. W. 1998. Eicosanoids mediate insect cellular immune reactions to bacterial infections. *In: Recent advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene Research*. Sinzinger, H., B. Samuelsson, J. Vane, R. Paoletti P, Ramwell, and P. Wong (eds). New York: Plenum Press. pp. 359-362.
- Vázquez N., G. y O. Echeverría. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. 168 p.
- Zhang, Z., L. Shi, L. Xu, and Z. Wang. 2002. The present research and utilization situation of cochineal insects en the world. *For. Res. Beijing* 15: 719-726.