

**"Inervación táctil mecanosensible de la  
lengua de aves con diferentes conductas  
de manipulación"**

**Tesis  
Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Isidora Sofía Valdebenito Miqueles**

**Marzo, 2024**

**Director de Tesis Dr. Jorge Mpodozis Marín  
Codirectora de tesis Dra. Macarena Faunes Carvallo**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister en Ciencias Biológicas presentada por el candidato.

**Isidora Sofía Valdebenito Miqueles**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 18 de Diciembre de 2023.

Director de Tesis:

Dr. Jorge Mpodozis Marín .....

Codirectora de Tesis

Dra. Macarena Faunes Carvallo .....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Julio Alcayaga .....

Dra. Alexia Núñez .....

## RESUMEN BIBLIOGRÁFICO



Isidora nació el 09 de noviembre de 1995, en La Serena, región de Coquimbo. Desde pequeña tuvo un enorme amor y fascinación por las aves.

En el año 2014 entró a la Universidad de Chile al programa de Bachillerato, donde decidió que su lugar estaba en la facultad de ciencias. El 2015, ingresa a estudiar Licenciatura en ciencias, con mención en Biología.

Su sueño era tener un psitácido o un estrigiforme, y lo logró en el 2018 con la llegada de *Copérnico Archaeopteryx*.

Hoy junto a sus 8 cacatúas y Philippe (que no es un ave), han formado una gran familia plumífera.

## AGRADECIMIENTOS

A todas las aves que me permitieron adquirir valiosos conocimientos durante estos años. Espero que valiera la pena.

Para Alicia Sepúlveda, mi abuela y mejor amiga que, aunque no entiende mucho lo que hago, siempre me ha dado su amor infinito y el impulso para ser cada día mejor.

A Philippe Larroquette, por formar una familia conmigo, no dejarme caer en los momentos más difíciles y amarme tanto.

A mi mamá Vania Miqueles, a mi familia, mis amigos, colegas y docentes que me apoyaron en mi camino como científica y me aprendieron a querer tal como soy. Especialmente a Rodrigo Dover por prestarme su libro de química orgánica, por miles de tecitos, y por su enorme paciencia.

A mi bandada: *Copérnico, Mozarina, Hertha, Berlín, Valentina, Madame, Linda, Reptar y Lille*, por mostrarme día a día que puedo aprender más sobre las aves, y darme su amor incondicional en forma de plumas.

Agradezco profundamente mi estancia en la Universidad Católica, en el laboratorio del Dr. Botelho, donde pude aprender muchísimo gracias a una gran maestra y valiosa amiga: Mackarena Narváez.

A Macarena Faunes y Jompoma, extraordinarios mentores que han iluminado mi trayectoria. No habría llegado a este punto sin su valiosa guía.

# ÍNDICE DE MATERIAS

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
3.1 Mecanorreceptores .....	5
3.2 Mecanorreceptores en aves .....	7
3.3 Inervación de la lengua .....	10
3.4 Proyecciones centrales de la lengua .....	12
3.5 Especializaciones táctiles mecanosensibles en la lengua .....	13
3.6 Hábitos alimentarios y de manipulación de las especies estudiadas .....	14
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>18</b>
4.1 Objetivo general .....	18
4.2 Objetivos específicos .....	19
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
5.1 Adquisición de ejemplares y protocolo de manejo .....	20
5.2 Inyecciones de AM1-43 .....	21
5.3 Eutanasia y perfusión intracardiaca .....	21
5.4 Extracción de lenguas .....	21
5.5 Extracción de encéfalos .....	22
5.6 Elaboración de cortes histológicos en gelatina .....	22
5.7 Elaboración de cortes histológicos en parafina y tinciones de Hematoxilina eosina y Tricrómica de Masson .....	23
5.8 Tinción de Nissl .....	25
5.9 Volumen trigeminal relativo .....	26
5.10 Conteo de número de papilas y modelos tridimensionales .....	26
5.11 Conteo de mecanorreceptores promedio por papila .....	27
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
6.1 Morfología de la lengua .....	28
6.2 Órganos terminales mecanorreceptores en la lengua .....	33
6.3 Número y distribución de papilas en las lenguas de las aves en estudio .....	36
6.4 Estimación de corpúsculos de Grandry y Herbst por papila de las aves en estudio .....	40
6.5 Estimación de volúmenes relativos del trigémino principal .....	45
6.6 Posibles botones gustativos en la lengua del pollo .....	48
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>51</b>
7.1 Morfología de la lengua, tejidos que la componen y su relación con los grados de manipulación .....	52
7.2 Identificación y caracterización de los terminales encapsulados de mecanorreceptores .....	55
7.3 Abundancia y distribución de los corpúsculos de Herbst y Grandry .....	56
7.4 Relación del volumen relativo del PrV con respecto a la representación en la lengua de las aves en estudio .....	60
7.5 Potenciales botones gustativos en el pollo .....	61
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>64</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Terminales de Meissner, Grandry, Pacini y Herbst.....	9
<b>Figura 2.</b> Curso periférico del nervio hipogloso (XII) y el vago (X) y sus terminaciones centrales en el tronco encefálico ipsilateral en <i>Taeniopygia guttata</i> .....	11
<b>Figura 3.</b> Diagrama de especies en estudio.....	17
<b>Figura 4.</b> Morfología de las lenguas de las especies en estudio.....	31
<b>Figura 5.</b> Histología del ápice de las lenguas de las especies en estudio.....	32
<b>Figura 6.</b> Caracterización de los mecanorreceptores de Grandry y Herbst.....	35
<b>Figura 7.</b> Inyecciones del trazador AM1-43.....	38
<b>Figura 8.</b> Reconstrucciones tridimensionales de lenguas que presentan papilas.....	39
<b>Figura 9.</b> Corpúsculos de Herbst y de Grandry por papila de las aves en estudio.....	43
<b>Figura 10.</b> Medición del volumen trigeminal relativo en el PrV.....	46
<b>Figura 11.</b> Potenciales botones gustativos de la lengua del pollo ( <i>Gallus gallus</i> ). .....	50
<b>Figura 12.</b> Morfología de las lenguas de aves.....	53
<b>Figura 13.</b> Tipos de papilas gustativas en aves.....	63

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Estimación del número de papilas por especie. ....	37
<b>Tabla 2.</b> Estimación del diámetro promedio de corpúsculos de Grandry y Herbst en las especies en estudio.....	42
<b>Tabla 3.</b> Estimación corpúsculos de Herbst y Grandry por especie. ....	44
<b>Tabla 4.</b> Volúmenes del PrV relativos al peso del encéfalo para cada especie en estudio. ....	48

## LISTA DE SÍMBOLOS/ABREVIATURAS

nTTD	Núcleos del tracto trigémino descendente
nTTDc	Núcleos del tracto trigémino descendente pars caudalis
nTTDi	Núcleos descendentes del tracto trigémino descendente
nTTDo	Núcleos del tracto trigémino descendente, pars oralis
PrV	Núcleo trigeminal principal
TTD	Tracto trigeminal descendente
X	Nervio vago
XII	Nervio hipogloso

## 1. RESUMEN

Las aves utilizan el pico y la lengua para alimentarse y manipular objetos. Los diferentes comportamientos entre los taxones de aves se reflejan en la diversidad morfológica de estos órganos. Los receptores mecanosensoriales de la lengua aviar han sido estudiados en unas pocas especies. En aves granívoras (estrílidas y fringílidos) y en psitácidas, se ha demostrado que existen papilas dérmicas linguales que contienen corpúsculos de Herbst (equivalentes a los receptores de Pacini) y corpúsculos de Grandry (equivalentes a los corpúsculos de Meissner). Estos estarían asociados a conductas que abarcan desde descascarar una semilla hasta la construcción de un nido.

Nos propusimos explorar morfología y distribución de dos tipos de mecanorreceptores linguales aviares estudiándolos en aves con diferentes conductas de manipulación. Examinamos la lengua de un paserino (*Taeniopygia guttata*), dos psitácidos (*Melopsittacus undulatus* y *Myiopsitta Monachus*) y el un galliforme (*Gallus gallus*). Para revelar la localización de los corpúsculos mecanosensoriales en la lengua, realizamos inyecciones intraperitoneales del trazador neuronal fluorescente AM1-43. Encontramos diferencias significativas en la organización, el tamaño y la estructura de los corpúsculos. También se encontró diferencias en el número y la distribución de

los mecanorreceptores entre especies, incluso entre las dos psitácidas. La lengua de *Gallus gallus*, una especie granívora que no desgrana semillas no presenta estructuras de papilas dérmicas observables en su lengua.

Nuestros resultados sugieren que el número y la distribución de los mecanorreceptores están asociados al grado de manipulación que realizan.

## 2. ABSTRACT

Birds employ their beaks and tongues for various behaviors, including feeding and manipulating objects. The morphological diversity of these organs reflects the wide range of behaviors observed across different bird species. Mechanosensory receptors of the avian tongue have only been studied in a few species. Granivorous estrildid and fringillid finches and psittacine birds such as parrots and parakeets possess lingual dermal papillae containing an arrangement of Herbst corpuscles (equivalent to mammalian Pacini receptors) and Grandry corpuscles (equivalent to Meissner corpuscles). These likely mediate seed shelling, which these birds perform in the oral cavity. Description of lingual receptors in further avian taxa is needed to understand whether and how the organization of the tongue touch receptors varies across birds with different feeding behaviors.

We aimed to explore the diversity of avian tongue mechanoreceptors by studying their morphology and distribution in birds with different feeding habits. We examined the tongue of a passerine (*Taeniopygia guttata*), two psittacids (*Melopsittacus undulatus* and *Myiopsitta Monachus*), and galliform (*Gallus gallus*). To reveal the location of mechanosensory corpuscles in the tongue, we performed intraperitoneal injections of the activity-dependent fluorescent nerve terminal probe AM1-43.

We found striking differences in the organization, number, and distribution of encapsulated mechanoreceptor terminals across species, even between the two psittacids. The tongue of *Gallus gallus*, a granivorous species that does not shell seeds, did not exhibit mechanosensory papillae.

Our results suggest that the number and distribution of mechanoreceptors is associated with the type of behaviors.

### **3. INTRODUCCIÓN**

La sensorialidad táctil está presente en todos los vertebrados y en el caso de las terminaciones encapsuladas que dan origen al tacto fino, se basa en la detección de estímulos mecánicos en la piel mediante terminales encapsulados de mecanorreceptores de bajo umbral, cuyos somas se ubican en ganglios sensoriales (Ziolkowski et al., 2022). La lengua de las aves, que es el órgano que analizamos en esta tesis, recibe inervación somatosensorial de receptores cuyos somas residen en el glosofaríngeo superior y vago superior (Dubbeldam et al., 1979; Wild, 1981, 1990).

#### **3.1 Mecanorreceptores**

La mayor parte de lo que sabemos sobre el sistema somatosensorial proviene del trabajo en mamíferos. La transducción sensorial ocurre en la mayoría de los casos en la terminación periférica de las células pseudounipolares de los ganglios sensoriales. En algunos mecanorreceptores, como los corpúsculos de Merkel, la transducción está asociada a la participación de células receptoras (Ikeda et al., 2014). Éstas pueden ser activadas por diversos estímulos mecánicos, como son presión, estiramiento, ondas sonoras y movimiento (Schneider et al., 2016).

Se han descrito 4 categorías principales de mecanorreceptores táctiles en la piel glabra: corpúsculos de Merkel, Meissner, Ruffini y Pacini (Iheanacho & Vellipuram, 2023).

Los corpúsculos de Merkel están ubicados bajo la epidermis de los mamíferos, asociadas a la piel glabra y también al epitelio nasal (Piccinin et al., 2023). Éstos consisten en una terminación nerviosa en forma de disco, asociada a una célula especializada. Sus respuestas son de adaptación lenta (responden sostenidamente a la presencia del estímulo) y participan en la discriminación estática de formas, bordes y texturas rugosas (Nieuwenhuys & Van Huijzen, 2007).

Los corpúsculos de Meissner también se ubican bajo la epidermis, y son más sensibles a las vibraciones de baja frecuencia, entre 10 y 50 Hz, pudiendo responder a hendiduras cutáneas de menos de 10 micrómetros. Además, estos corpúsculos pueden detectar el deslizamiento entre un objeto y la piel, lo que permite controlar el agarre (Piccinin et al., 2023). Son de forma alargada, envueltos por una cápsula de tejido conectivo que comprende varias laminillas de células de Schwann. El centro de la cápsula contiene una o más fibras nerviosas aferentes que generan potenciales de acción de adaptación rápida después de una depresión cutánea mínima (Nieuwenhuys & Van Huijzen, 2007).

Los corpúsculos de Ruffini son de adaptación lenta, que detectan vibraciones y texturas finas (Iheanacho & Vellipuram, 2023) . Presentan una forma alargada, y se sitúan en las profundidades de la piel, así como en ligamentos y tendones.

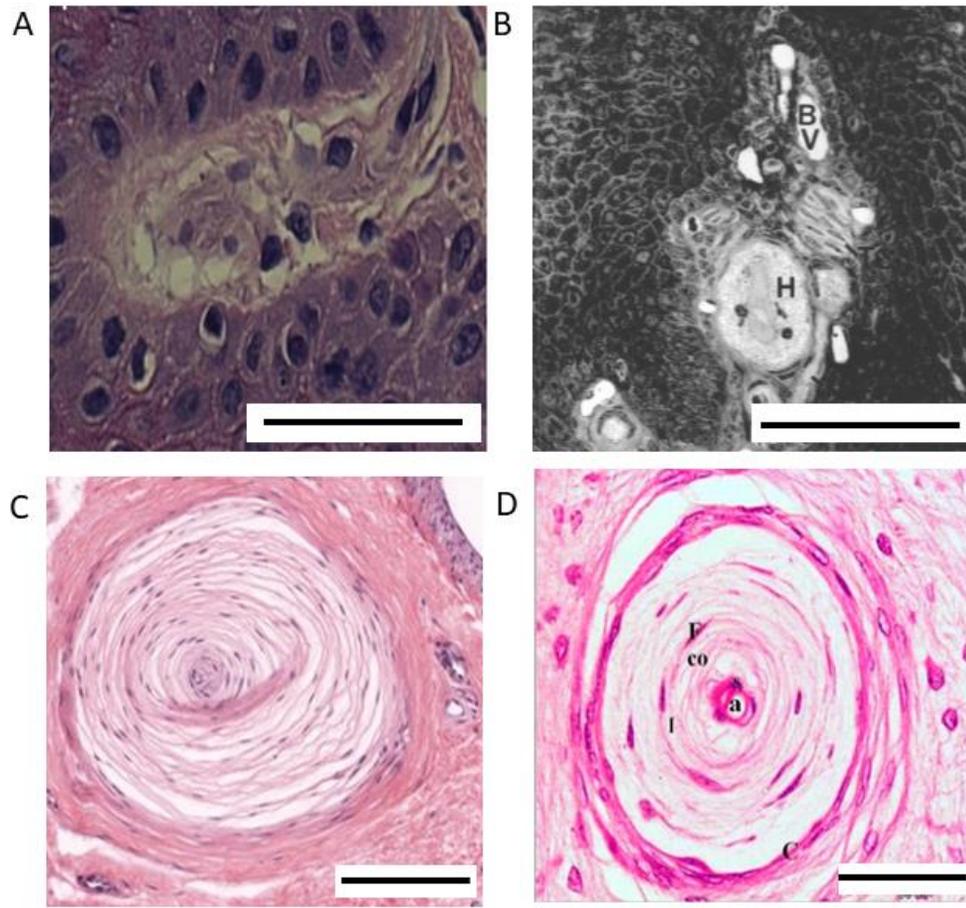
Los corpúsculos de Pacini se localizan en la profundidad de la dermis. Tienen forma de cebolla en la que el núcleo interno de las laminillas se encuentra separada de las externas por cavidades con líquido. Estas estructuras tienen un axón aferente de rápida adaptación en el centro y están involucradas en la discriminación de texturas superficiales finas u otros estímulos en movimiento que producen vibraciones de alta frecuencia en la piel (Nieuwenhuys & Van Huijzen, 2007).

### **3.2 Mecanorreceptores en aves**

En aves, se ha demostrado que existen estructuras análogas a los corpúsculos de Meissner y de Pacini. Estos corpúsculos son conocidos respectivamente como corpúsculos de Grandry y de Herbst. Los corpúsculos de Grandry son abundantes en el pico de algunas aves como, por ejemplo, en aves acuáticas como los patos, que utilizan el tacto del pico para obtener el alimento (Gottschaldt, 1985). Estos órganos terminales, de adaptación rápida, se ubican en la parte superficial de la dermis bajo la epidermis. Constan de una pila ordenada de células (llamadas células de Grandry) donde se intercalan terminales en forma de disco, formando un complejo cubierto por células de

Schwann. Estudios de microscopía electrónica han revelado que las células de Grandry, además, comparten una serie de características citológicas con las células de Merkel en mamíferos (Gottschaldt, 1985).

Los corpúsculos de Herbst, por otra parte, responden a estímulos vibratorios y se ubican en la profundidad de la dermis (Shen & Xu, 1994). Se componen de un terminal nervioso rodeado por un sistema laminar de células de Schwann, delimitado por una cápsula externa de colágeno. Existen versiones simplificadas de este corpúsculo en la piel de las Palomas, que podrían considerarse también como pequeños corpúsculos de Pacini. Es importante señalar, que según la ubicación que tengan y la edad del animal, el número, grosor y distancia entre las laminillas puede variar. En un ganso adulto, por ejemplo, pueden llegar a tener hasta 80 laminillas, aunque en pichones el núcleo interno es de mayor diámetro, mientras que las laminillas son más gruesas y se encuentran más distanciadas (Gottschaldt, 1985). Otro caso, es el del paladar del pollo, donde la estructura del núcleo interno es similar a la de los pichones de ganso, con laminillas individuales gruesas y separadas por espacios más amplios, pero la forma del corpúsculo cambia, siendo los de pollo considerablemente más pequeños que en los gansos y con una forma más alargada (Bubien-Waluszewska, 1979).



**Figura 1. Terminales de Meissner, Grandry, Pacini y Herbst.** Microfotografía de un corte de piel humana con tinción de hematoxilina eosina, mostrando corpúsculo de Meissner (modificado de (Verendeev et al., 2015)). B corresponde a fotografía de un corpúsculo de Grandry de un diamante mandarín con tinción azul de toluidina (modificado de Wild, 1990). C corresponde a fotografía de un corpúsculo de Pacini de piel humana con tinción hematoxilina-eosina (barra escala 200  $\mu\text{m}$ ) (modificado de Quindlen et al., 2016). D corresponde a fotografía de corpúsculo de Herbst del pico de un pato con tinción hematoxilina-eosina (modificado de Soliman & Madkour, 2017). Barra escala de 50  $\mu\text{m}$ .

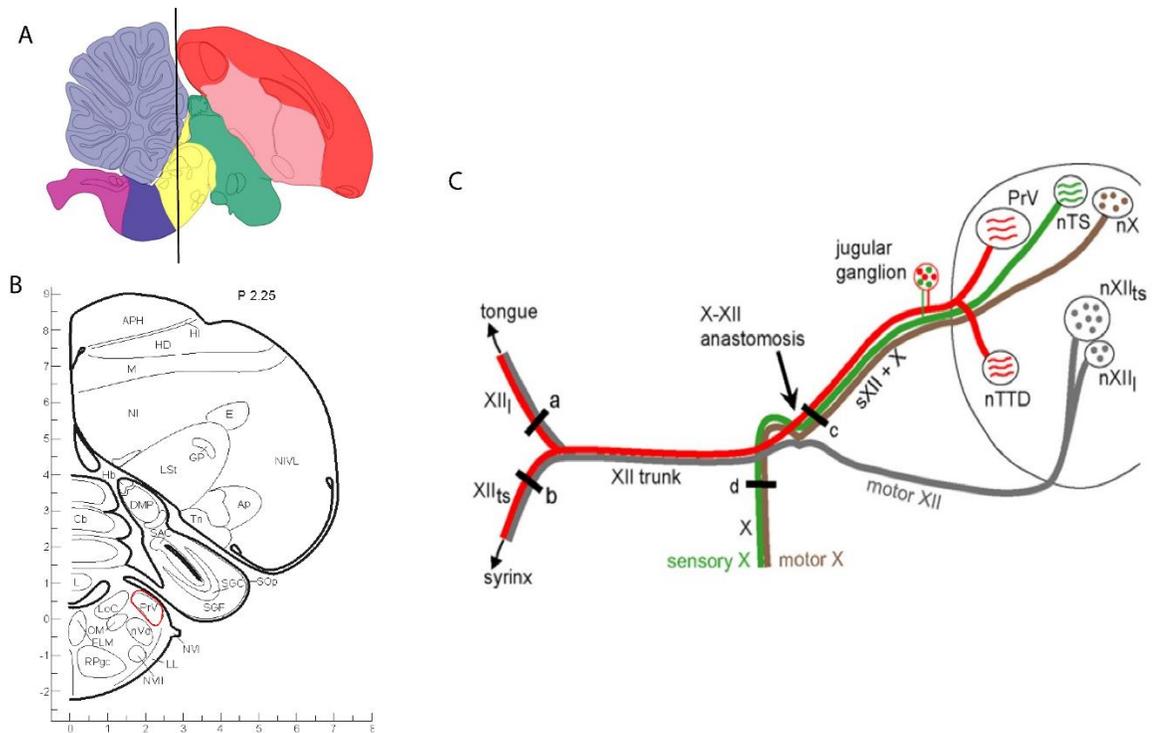
### 3.3 Inervación de la lengua

En mamíferos la lengua recibe inervación somatosensorial principalmente del nervio trigémino, inervación gustativa de los nervios facial y glossofaríngeo, e inervación motora del nervio hipogloso (Striedter & Northcutt, 2019).

En aves la situación es un poco diferente. Por una parte, la lengua de las aves casi no tiene receptores gustativos, y cuando éstos están presentes, se ubican principalmente en su raíz (Rowland et al., 2015). Estos receptores son inervados por el nervio glossofaríngeo, mientras que los receptores gustativos del pico y de la cavidad oral (bastante más numerosos que los de la lengua), son inervados por los nervios facial y glossofaríngeo, los cuales proyectan al núcleo del tracto solitario (Bubien-Waluszewska, 1979).

Otra diferencia importante es que, si bien el pico y gran parte de la cavidad oral son inervadas por el nervio trigémino, la lengua no recibe inervación trigeminal (Bubien-Waluszewska, 1979). Los somas de los mecanorreceptores linguales se encuentran en el denominado *ganglio yugular*, que corresponde a la fusión de los ganglios superiores de los nervios glossofaríngeo y vago (Bubien-Waluszewska 1979). En algunas aves, como patos, los procesos periféricos de estas neuronas llegan a la lengua a través de la rama lingual del nervio glossofaríngeo, la cual recorre unilateralmente la lengua por su superficie dorsal desde la base hasta la punta (Dubbeldam et al., 1979). Tanto en psitácidos (loros) como paserinos (aves cantoras), algunos o todos los axones de los

mecanorreceptores del ganglio yugular se separan del nervio glossofaríngeo a la salida de los ganglios y se unen al nervio hipogloso. Este último alcanza la lengua por su superficie ventral, y lleva entonces una mezcla de axones motores y somatosensoriales (Fig. 2) (Bottjer & To, 2012; Faunes & Wild, 2017; Wild, 1981, 1990). Los receptores somatosensoriales proyectan centralmente a los núcleos del complejo trigeminal (Bottjer & To, 2012).



**Figura 2. Curso periférico del nervio hipogloso (XII) y el vago (X) y sus terminaciones centrales en el tronco encefálico ipsilateral en *Taeniopygia guttata*.** A) Anatomía del cerebro de *Taeniopygia guttata*, vista sagital. Línea negra indica ubicación aproximada del PrV. (Adaptado de *Zebra Finch Expression Brain Atlas*, 2021). B) Plano coronal del cerebro que indica ubicación del PrV en rojo (Adaptado de Brauth et al.). C) *Curso periférico del nervio hipogloso (XII) y vago (X)*. nXIII, núcleo hipogloso lingual; nXII<sub>ts</sub>, núcleo hipogloso traqueosiringíneo; XII<sub>l</sub>, nervio lingual, nXII<sub>ts</sub>, nervio traqueosiringíneo; nX, núcleo motor dorsal del vago; X, nervio vago (Adaptado de Bottjer & To, 2012).

### 3.4 Proyecciones centrales de la lengua

Los núcleos del complejo trigeminal corresponden a los blancos centrales de todos los receptores somatosensoriales de la región de la cabeza, incluyendo los del ganglio trigeminal (nervio V), geniculado (nervio VII), ganglio superior del glosofaríngeo (nervio IX) y ganglio superior del nervio vago (X).

En las aves se ha descrito una organización del sistema trigeminal altamente conservada respecto a los mamíferos. El nervio trigémino emerge a nivel del puente rostral, lugar donde se encuentra el núcleo trigémino principal (PrV). Parte de las fibras trigeminales terminan en este núcleo, y parte forma el tracto trigeminal descendiente, que cursa caudalmente por el borde lateral del tronco encefálico hasta llegar a la asta dorsal de la médula espinal cervical. Junto al tracto trigeminal descendiente encontramos una columna de núcleos somatosensoriales conocidos colectivamente como los núcleos del tracto trigeminal descendiente (nTTD). En paseriformes, se ha descrito que los aferentes linguales llegan hasta la región medial del asta dorsal rostral, en la región dorsolateral de los nTTD, así como en un subnúcleo específico de la porción más rostral de éstos, y profusamente en la región dorsolateral del PrV llegando a ocupar gran parte de este núcleo (Bottjer & Arnold, 1982; Faunes & Wild, 2017; Wild, 1990). Estudios previos, como los de Wild (1981) muestran que en la cacatúa Galah (*Eolophus roseicapilla*), existe un patrón similar del PrV que podría reflejar una cercana relación filogenética entre paseriformes y psitácidos.

En otras especies de aves como el ánade real, los aferentes linguales que viajan a través del nervio glossofaríngeo terminan en la parte medial de la asta dorsal rostral, la parte dorsomedial del nTTD, y en subnúcleos trigeminales específicos en las regiones dorsomediales del TTD rostral y el PrV.

### **3.5 Especializaciones táctiles mecanosensibles en la lengua**

Se ha mostrado que la distribución y cantidad de corpúsculos de Meissner y Pacini en distintos órganos varía en función del uso en diferentes especies (Vega et al., 2009). En vertebrados existen muchos casos de especializaciones táctiles mecanosensibles en el rostro, generalmente asociados al tipo de alimentación. Por ejemplo, la topo nariz de estrella, un mamífero prácticamente ciego que se alimenta de pequeños invertebrados que encuentra en el suelo, posee una serie de apéndices periorales (su “nariz de estrella”) que contienen estructuras táctiles denominadas órganos de Eimer, donde hay corpúsculos de Pacini y Merkel. En varios grupos de aves que buscan comida con el pico en el agua, barro, o arena, tales como Anseriformes (patos) y Charadriiformes (playeros), la punta del pico contiene un órgano táctil formado por varias papilas en las cuales se ubican cuantiosos receptores de Grandry y de Herbst. Las especializaciones periféricas están acompañadas de aumentos en la representación de estructuras táctiles en el sistema nervioso central. El núcleo trigeminal principal es mayor en patos y playeros que en otros grupos de aves, a excepción de los loros (Gutiérrez-Ibáñez et al., 2009). En el caso de estos últimos, que, a diferencia de los otros dos grupos, detectan los alimentos

visualmente, este aumento en el tamaño del núcleo trigeminal se podría deber a la hábil manipulación de alimentos con el pico, paladar y sobre todo la lengua (Demery et al., 2011).

Así como los loros, algunos passeriformes manipulan alimentos dentro del pico. Aves de las familias Estrildidae y Fringillidae pelan semillas, descartan la cáscara y tragan la parte interior de éstas. Esta conducta involucra rápidos movimientos de la lengua y el pico, entre los cuales la semilla es sostenida durante el proceso (Mielke y Van Wassenbergh, 2022). Sus lenguas contienen papilas táctiles con corpúsculos de Herbst, innervadas por el nervio hipogloso (Wild, 1990). También al igual que los psitácidos (Wild, 1981) , estrílicos y fringílicos poseen una importante representación de la lengua en los núcleos trigeminales, llegando a ocupar la mitad del núcleo trigeminal principal y buena parte de los nTTd (Faunes & Wild, 2017; Wild, 1990). Sin embargo, esta proyección somatosensorial y su representación central es desconocida y ha sido parcialmente descrita en loros (Wild, 1981).

### **3.6 Hábitos alimentarios y de manipulación de las especies estudiadas**

Debido a la cercanía filogenética existente entre paserinos y psitácidos (Mackiewicz et al., 2019) es que se escogieron loros (2 especies), passeriformes (1 especie), y como grupo externo, lejano en la filogenia a los mencionados, un galliforme.

A continuación, se describen los hábitos alimentarios y de manipulación de las aves en estudio:

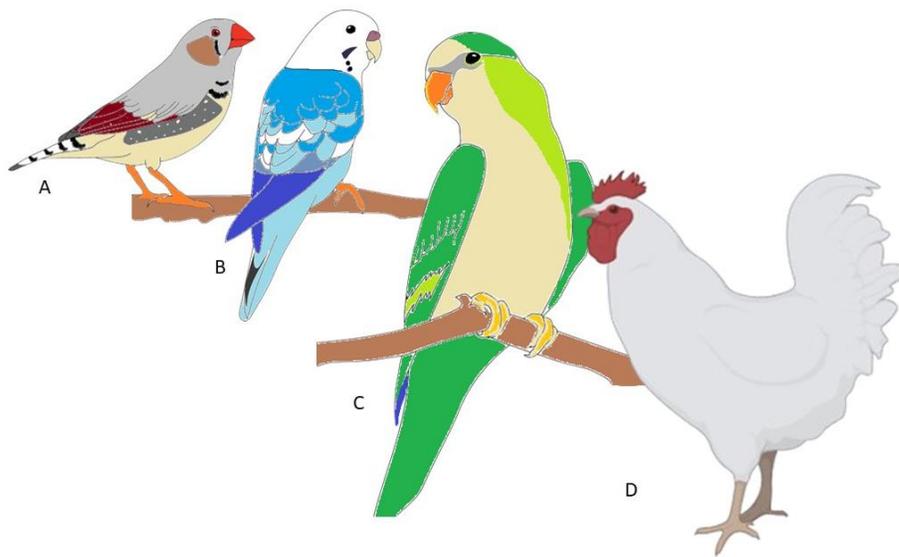
- Diamante mandarín (figura 3A) (*Taeniopygia guttata*, orden Passeriformes, familia Estrildidae). Su dieta se basa principalmente en alimentos altos en carbohidratos como semillas, las cuales pela utilizando su cavidad oral y además con la ingesta de algunos insectos ocasionalmente (Brzęk et al., 2010). Además esta ave presenta conductas de manipulación con su lengua y pico en la construcción de nidos (Muth & Healy, 2014), en el acicalamiento de sus plumas (Slater & Ollason, 1972).
- Catas o periquitos australianos (Figura 3B) (*Melopsittacus undulatus*, orden Psittaciformes familia Psittaculidae). Con una alimentación principalmente granívora, donde manipulan el grano y lo pelan, utilizando su cavidad oral (Wyndham, 1980)  
  
Esta ave, si bien no construye nidos, exhibe conductas de manipulación de objetos y uso de su pico para escalar (Wyndham, 1980).
- Cotorra argentina (figura 3C) (*Myiopsitta monachus*, orden psittaciformes, familia Psittacidae) tienen una dieta generalista, que incluye una amplia gama de semillas silvestres y cultivadas, frutas y materia vegetal, incluyendo semillas de hierba y grano, las cuales seleccionan cuidadosamente, pelándolas. También se alimentan de tallos de cactus,

tubérculos y frutos de árboles, y a veces insectos y sus larvas (Juniper et al., 1998). Además, estas cotorras son propensas a vivir en zonas urbanas y suburbanas, donde utilizan mucho los comederos de traspatio, comiendo semillas de girasol, pan y cualquier otro alimento proporcionado por los humanos (Mazzoni et al., 2022).

Además, éste es uno de los pocos loros que construyen nidos, la mayoría de los psitácidos anidan en huecos de árboles e incluso algunos a ras de piso (Juniper et al., 1998).

La cotorra argentina construye su nido con ramas, formando estructuras de aspecto globular con una cámara interior. Un nido nuevo puede ser construido adosado a uno ya preexistente, formando de esta forma un nido compuesto que consta de varias cámaras independientes (Bucher et al., 1990), construcciones que reflejan la naturaleza altamente social de estos animales.

- Pollo (Figura 3D) (*Gallus gallus*, orden Galliformes, familia Phasianidae) (figura 3D) Alimentación omnívora, generalista. El pollo no exhibe conductas que involucren manipulación compleja de alimentos u otros objetos, como las descritas para passeriformes y loros.



**Figura 3. Diagrama de especies en estudio.** A) diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*), B) periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*), C) cotorra argentina (*Myiopsitta monachus*), D) pollo (*Gallus gallus*).

## 4. HIPÓTESIS

Es claro que la lengua tiene terminales encapsulados de mecanorreceptores (Gottschaldt, 1985; Krulis, 1978; Toyoshima, 1989; Wild, 1981).

Nuestra hipótesis es que: *“existen diferencias en la distribución y abundancia de los terminales encapsulados de mecanorreceptores en la lengua, así como en su representación central en el complejo trigeminal sensorial, en aves con diferentes usos de las lenguas, derivados de sus modos de vida. Aves con mayor uso de la lengua para la manipulación de objetos, tales como catas y diamantes, poseen mayor número y/o densidad de mecanorreceptores en la lengua, con una mayor representación de este órgano en los núcleos trigeminales, que aves que hagan relativamente poco uso de ésta”*.

### 4.1 Objetivo general

Describir la inervación táctil mecanosensible de la lengua en diferentes especies de aves, utilizando ejemplares de *Taeniopygia guttata* (diamante mandarín), *Melopsittacus undulatus* (periquito australiano), *Myiopsitta monachus* (cotorra argentina) y *Gallus gallus* (pollo).

## **4.2 Objetivos específicos**

- I. Identificar y describir terminales mecanosensitivos encapsulados en la lengua de las diferentes aves en estudio.
- II. Identificar y comparar la morfología, el número y distribución de terminales mecanosensitivos encapsulados de la lengua.
- III. Estudiar la relación del volumen relativo del trigémino principal sensorial con respecto a la representación en la lengua de las estructuras mecanosensitivas encapsuladas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Adquisición de ejemplares y protocolo de manejo

Se utilizaron en total 19 ejemplares de diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*, orden Passeriformes, familia Estrildidae), 16 ejemplares de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*, orden Psittaciformes familia Psittaculidae), 3 ejemplares de pollo (*Gallus gallus*, orden Galliformes, familia Phasianidae) y 3 ejemplares de cotorras argentinas (*Myiopsitta monachus*, orden Psittaciformes, familia Psittacidae).

Los ejemplares de diamante, periquito y pollo, una vez adquiridos a través de comercio formal, permanecieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile.

Las cotorras argentinas fueron adquiridas a través de captura por medio de redes. Al ser estas declaradas plagas, no se ha requerido permiso de servicio agrícola ganadero para su captura.

Los experimentos fueron previamente aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, el CICUA (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales) bajo el certificado N° 21498 – FCS – UCH.

## **5.2 Inyecciones de AM1-43**

Para visualizar los órganos mecanorreceptores terminales, se realizaron inyecciones intraperitoneales del trazador AM1-43 en dosis de 3 mg/kg (Meyers et al., 2003). Este compuesto marca una variedad de células sensitivas y ha sido recientemente utilizado para la visualización de la inervación periférica (Nishikawa, 2011). Luego de la inyección, se esperó un período de 2 horas para eutanasiar a los ejemplares, siguiendo el protocolo descrito de eutanasia y perfusión intracardiaca (sección 5.3).

## **5.3 Eutanasia y perfusión intracardiaca**

Los ejemplares utilizados en esta tesis fueron eutanasiados por medio de inyección de ketamina-xilacina 100/40 mg/Kg peso corporal, respectivamente. Inicialmente, se llevó a cabo el pesaje de los especímenes, seguido por la administración progresiva de la anestesia con la concentración especificada, aumentando gradualmente hasta alcanzar niveles de sobredosis. Finalmente, se procedió a realizar perfusión intracardiaca con suero salino y paraformaldehído (PFA) 4% en PBS (buffer fosfato 0,1 M pH 7.4).

## **5.4 Extracción de lenguas**

Una vez realizada la perfusión intracardiaca y posterior a fijar el tejido por 72 horas en solución de PFA 4% en PBS (buffer fosfato 0,1 M pH 7.4), se extrajo la lengua del ave, ingresando por la mandíbula con un bisturí, cortando ambas comisuras del pico para exponer la mandíbula y la lengua. Se extrajo el órgano,

cortando con una tijera la parte posterior de éste. Una vez extraídas las lenguas, éstas fueron medidas utilizando un pie de metro y fotografiadas con lupa Zeiss modelo Stemi-508 para posteriormente seguir los procedimientos descritos en los métodos 5.6 y 5.7.

### **5.5 Extracción de encéfalos**

Posterior al proceso de perfusión, se realizó una pequeña craneotomía para permitir la post-fijación del encéfalo, y la cabeza se mantuvo en PFA por un período de al menos 72 hrs. Luego se extrajo el encéfalo cuidadosamente, y se preparó para cortar.

### **5.6 Elaboración de cortes histológicos en gelatina**

Una vez fijados en PFA 4% en PBS 0,1 M, pH 7.4, se extrajeron los órganos de interés. Éstos fueron equilibrados en sacarosa 30% por un período de al menos 24 hrs, para posteriormente ser embebidos en gelatina (concentración 12% gelatina 12% sacarosa). Posterior a la fijación del bloque en PFA y equilibrado nuevamente en sacarosa 30%, se cortaron secciones transversales de la lengua de un grosor de 45  $\mu\text{m}$  y secciones coronales de tronco encefálico de 45  $\mu\text{m}$ , las que posteriormente fueron almacenadas en solución PBS 1% o fueron montadas inmediatamente en orden para las secciones de estereología.

## **5.7 Elaboración de cortes histológicos en parafina y tinciones de Hematoxilina eosina y Tricrómica de Masson**

Las lenguas fueron procesadas en el procesador de tejidos **STP120-MYR**. Las muestras fueron cortadas entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  en el micrótomo **SRM200-SAKURA**, luego fueron desparafinadas e hidratadas gradualmente, hasta llegar al agua destilada. Se obtuvieron dos réplicas de corte, una para tinción de hematoxilina-eosina y una para tinción tricrómica de Masson.

Para la tinción de hematoxilina-eosina, se utilizó protocolo descrito por Carson y Cappellano, 2015. Esta tinción nos permite ver marcados en diferentes colores distintos niveles de tejidos. En color rosado se puede observar citoplasma y matriz extracelular y en color morado ácidos nucleicos presentes en los núcleos celulares (Santos Vidal, 2017)

Para la tinción tricrómica de Masson se utilizó un protocolo modificado a partir del de Carson y Cappellano, 2015. Primero se preparó el tejido sumergiendo los cortes montados en portaobjetos previamente silanizados en líquido de Bouin durante 1 hora a 56-60 °C o 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se enfrió y se lavó con agua corriente hasta desaparecer el color amarillo que queda inicialmente en el tejido, y luego de ello, se realizó un lavado en agua destilada.

Se tiñeron los núcleos con hematoxilina férrica de Weigert durante 10 minutos y se lavó en agua corriente por 10 minutos. Para corroborar los resultados, observó al microscopio esperando ver los núcleos de las células negros. Luego se lavó con agua destilada y se tiñó con Briebrich Scarlet-Fucsina ácida por 2 minutos. A continuación, se pasó por agua destilada y se dejó por 15 minutos en la solución de ácido fosfomolibdico- fosfotúngstico. Para terminar, se hizo un lavado rápido con agua destilada de entre 10 a 20 segundos e inmediatamente se deja tiñendo en azul de anilina por 5 minutos. A continuación, se lavó en agua destilada y se sumergió en ácido acético glacial 1% por 4 minutos, lo cual es necesario para que se desprenda todo el colorante sobrante.

Las muestras por consiguiente se deshidrataron, aclararon y fueron cubiertas con medio de montaje (Entellan <sup>TM</sup>).

La tinción tricrómica de Masson permite visualizar diferentes tejidos. Fibras colágenas y tejido conectivo en color azul. Citoplasma y queratina de color rosado. Músculos y epitelios en color marrón-rojo y núcleos de células en color negro (Carson y Cappellano, 2015).

## 5.8 Tinción de Nissl

Luego de cortar las secciones de interés, éstas fueron montadas en portaobjetos embebidos en gelatina. Posteriormente, las muestras fueron secadas en oscuridad por un período de entre 12 a 24 hrs antes de realizar la tinción. Se utilizó un protocolo de tinción de Nissl modificado que consistió en lo siguiente:

Se preparó una solución stock (para tinción) que consistió en solución de volumen 224 mL que contenía acetato de sodio 0.003 M, ácido acético 0.074 M, y Cresyl violeta acetato (Merck Certistain) 0.0004 M.

Para llevar a cabo la tinción, se sumergieron los cortes previamente montados en portaobjetos gelatinizados en cloroformo durante 20 minutos. A continuación, se procedió a la hidratación de los cortes utilizando soluciones de etanol con concentraciones descendentes del 100%, 95%, 70%, 50%, hasta llegar a agua destilada, con incrementos de 3 minutos en cada etapa.

Posteriormente, los cortes montados fueron sumergidos en la tinción de Nissl a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se realizó la observación microscópica de los cortes para verificar el grado de absorción de la tinción, considerando que el tiempo mencionado previamente podría variar según las condiciones del tejido, como el grosor y el tamaño, entre otros factores. En caso de que la coloración estuviese demasiado saturada, se decoloró en etanol al

70% con unas gotas de ácido acético glacial.

Ya teñidos, los cortes montados se deshidrataron en alcoholes en concentración creciente (50%, 75%, 95%, 100% respectivamente). Una vez completado este proceso, los cortes fueron sumergidos en Xilol por 30 minutos. Finalmente, los cortes fueron cubiertos con medio de montaje (Entellan <sup>TM</sup>).

### **5.9 Volumen trigeminal relativo**

Se estimó el volumen del núcleo PrV a partir de secciones de encéfalo teñidas con tinción de Nissl. Utilizando un microscopio de campo claro equipado con una platina motorizada, se trazaron contornos del núcleo PrV en el software Stereoinvestigator®, sobre una serie de secciones con una distancia conocida entre cortes, para luego estimar el volumen de acuerdo con el método de Cavalieri (West et al., 1991). Para hacer comparaciones entre especies, los volúmenes estimados se estandarizaron por el peso del encéfalo fijado en PFA (justo después de su extracción desde el cráneo).

### **5.10 Conteo de número de papilas y modelos tridimensionales**

Se realizaron microfotografías de cortes histológicos con marcaje fluorescente (de AM1-43 y DAPI) utilizando microscopio automatizado Lionheart FX (Bio-teK). Los mecanorreceptores en la lengua fueron cuantificados mediante el método del fraccionador óptico (West et al., 1991). Utilizando la sonda de fraccionador óptico del software Stereoinvestigator ® se cuantificó una fracción

conocida del tejido de interés, para posteriormente realizar una estimación aproximada de las papilas presentes para cada especie, conociendo el grosor del corte y la distancia entre cada uno de ellos.

A través del software, también se obtuvieron modelos tridimensionales, que permitieron observar la distribución de estas papilas a lo largo de la región de interés de la lengua de cada ejemplar.

#### **5.11 Conteo de mecanorreceptores promedio por papila**

Utilizando la sonda de fraccionador óptico del software Stereoinvestigator ® y el método de Cavalieri (West et al., 1991) se procedió a realizar una cuantificación estimativa para una sección de lengua procesada a través de lo descrito en la sección 5.7. Posteriormente los datos fueron procesados utilizando el software de Microsoft Excel.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Morfología de la lengua**

Al estudiar los ejemplares presentados en este estudio, lo primero que resulta relevante es observar las diferencias morfológicas de los ápices de las lenguas. Esta caracterización morfológica se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección 5.7 de materiales y métodos.

Con respecto a la anatomía de las lenguas en aves, se ha mencionado que mantiene una morfología que, si bien varía, los tejidos que la componen son altamente conservados. En general las lenguas tienen una estructura que consiste en elementos esqueléticos cartilaginosos y óseos, los músculos y glándulas salivales (Hombberger & Meyers, 1989). Así como existen en el pico de aves anseriformes papilas cilíndricas compuestas de queratina, estas papilas se pueden encontrar formando estructuras cornificadas compuestas de queratina en la lengua (Iwasaki et al., 1997; Johnston, 2014).

Además de queratina, las lenguas se encuentran formadas por otros tejidos como músculos, nervios, vasos sanguíneos, diversos tejidos conectivos y glándulas (Johnston, 2014).

En aves como los loros este órgano es prominente y musculoso, a diferencia de otras aves como los galliformes, donde la lengua es puntiaguda apicalmente y ancha en su base, con poca o ninguna musculatura, lo que implicaría que la forma y el desarrollo de la lengua aviar varían en aves que tienen diferentes conductas de alimentación (Koenig et al., 2016).

En el caso de la especie *Taeniopygia guttata* (ver figura 4A) nos encontramos que su lengua tiene una forma puntiaguda y una capa externa formada por queratina (ver figura 4B), que es más delgada comparada con la de los psitácidos incluidos en este estudio. Esta lengua, fue medida en un individuo dando los siguientes resultados: largo de 5.10 mm desde el ápice a la zona media, 15.49 mm desde el ápice hasta la epiglotis y un grosor promedio de 2.06 mm y un ancho de 2.05 mm.

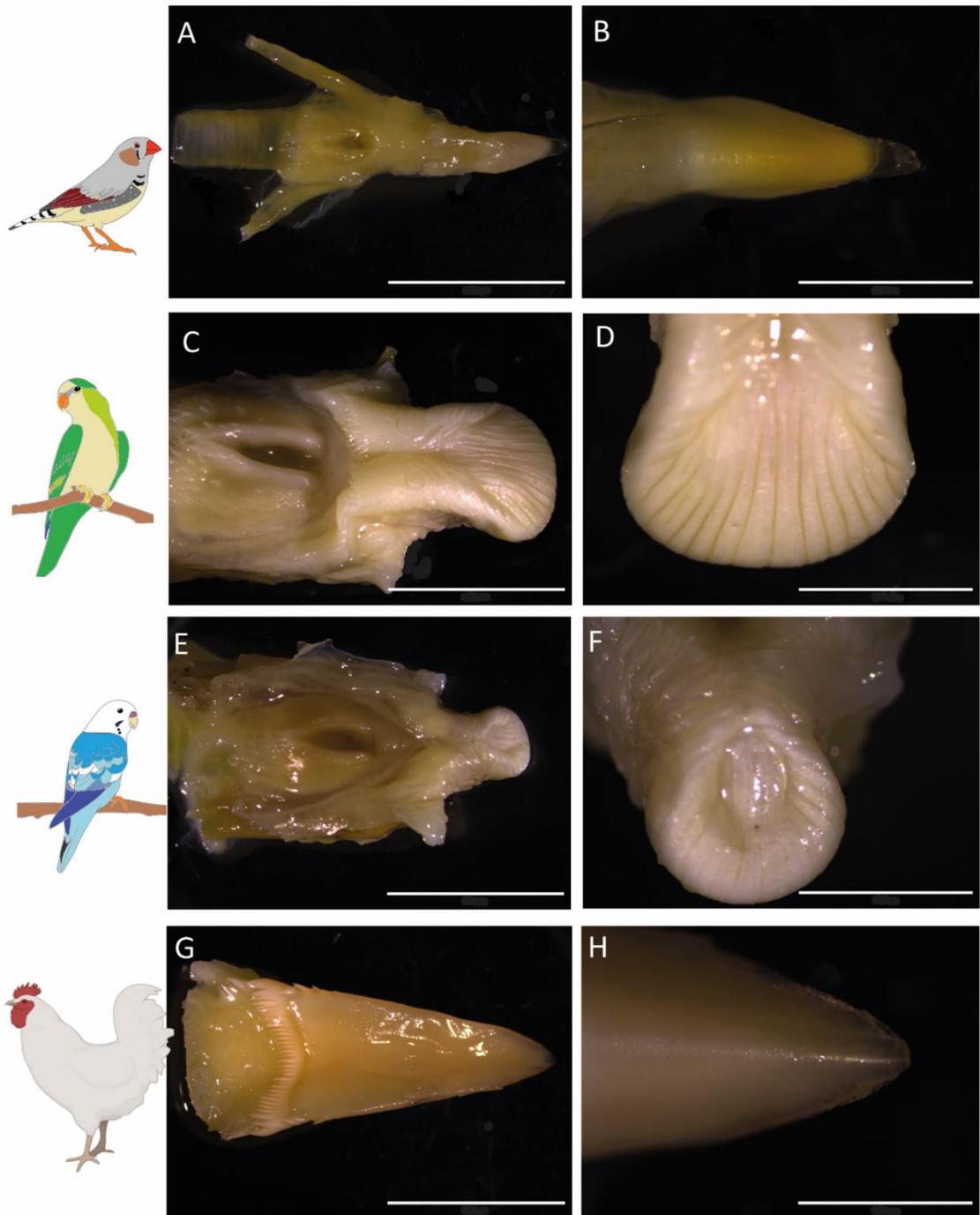
Los loros *Myiopsitta Monachus* y *Melopsittacus undulatus* presentan una lengua con una punta redondeada (ver figuras 4C y 4E), con una capa de queratina gruesa. En el caso de la cotorra, ésta presenta además unos surcos longitudinales en la superficie de la lengua (ver figura 4D). La lengua del ejemplar también es un poco aplanada a diferencia de la lengua del periquito australiano, que presenta una morfología más tubular (ver figura 4F).

Las dimensiones para la lengua de un ejemplar de *Myiopsitta Monachus* son las siguientes: de largo presenta 10.65 mm desde el ápice a la zona media de la lengua. 21.48 mm desde el ápice a la epiglotis, un ancho de 7.00 mm y un grosor promedio de 4.29 mm.

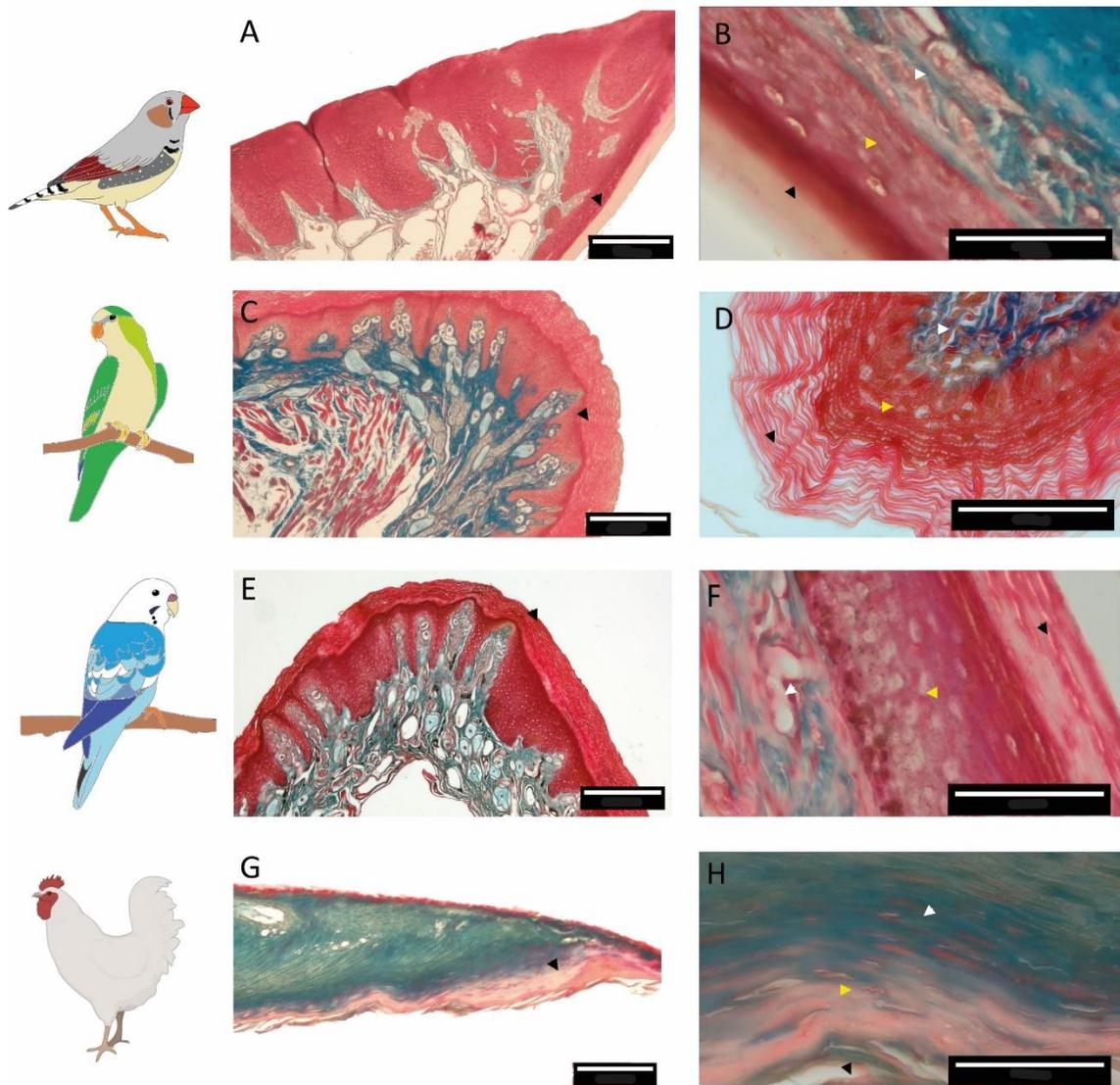
La medición de la lengua para un individuo de *Melopsittacus undulatus* presenta unas proporciones más pequeñas, con un largo de 15.30 mm desde el ápice hasta la epiglotis, donde 5.44 mm corresponden a la zona del ápice de la lengua hasta la zona media. Un ancho de 4.03 mm y un grosor promedio de 3.37 mm.

En el caso de la lengua del pollo se puede observar una lengua puntiaguda y aplanada, como la punta de una flecha (figura 4G). En la figura 4H se puede observar más a detalle la estructura cartilaginosa que posee la lengua esta ave. Las dimensiones de esta lengua para un individuo de *Gallus gallus* corresponden a 7.76 mm desde el ápice hasta la zona media, 16.82 mm desde el ápice hasta la zona posterior antes de comienzo de la epiglotis y un grosor promedio de 0.90 mm.

Todas las especies comparten en común la presencia de otros tejidos como tejido conectivo, epitelio y estructuras cartilaginosas, lo que se puede observar en la figura 5.



**Figura 4. Morfología de las lenguas de las especies en estudio.** Fotografías de lengua de aves y sus ápices. A, C, E y G en vista dorsal y B (vista dorsal), D (vista anterodorsal), G (vista anterodorsal), y H (vista dorsal). A y B corresponden a ejemplar de diamante mandarín, C y D a cotorra argentina, E y F a periquito australiano y G y H a pollo (Barra de calibración de 2000  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 5. Histología del ápice de las lenguas de las especies en estudio.** Fotomicrografías de campo claro de secciones sagitales de 3  $\mu\text{m}$  de grosor del ápice de la lengua de diferentes especies teñidas con la tinción tricrómica de Masson. La tinción de Masson produce una marca de color rojo en la queratina, cartílago y músculo, azul en tejido conectivo. A diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*). C cotorra argentina (*Myiopsitta Monachus*). E periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*) y G a un pollo (*Gallus gallus*). Las flechas negras indican las estructuras de queratina presentes en las lenguas, flechas amarillas tejido muscular y flechas blancas tejido conectivo (barra escala de 250  $\mu\text{m}$ ).

## **6.2 Órganos terminales mecanorreceptores en la lengua**

Para visualizar los corpúsculos de Herbst y Grandry se realizaron tinciones histológicas y marcaje con el trazador fluorescente AM1-43.

En las preparaciones histológicas, secciones delgadas (3-5  $\mu\text{m}$ ) de lengua teñidas con hematoxilina-eosina y tinción tricrómica de Masson (ver sección materiales y métodos 5.6), se observan claramente corpúsculos de Herbst, así como una marca similar a lo reportado para los corpúsculos de Grandry en el diamante mandarín, la cata australiana y en la cotorra argentina (Ver figura 6).

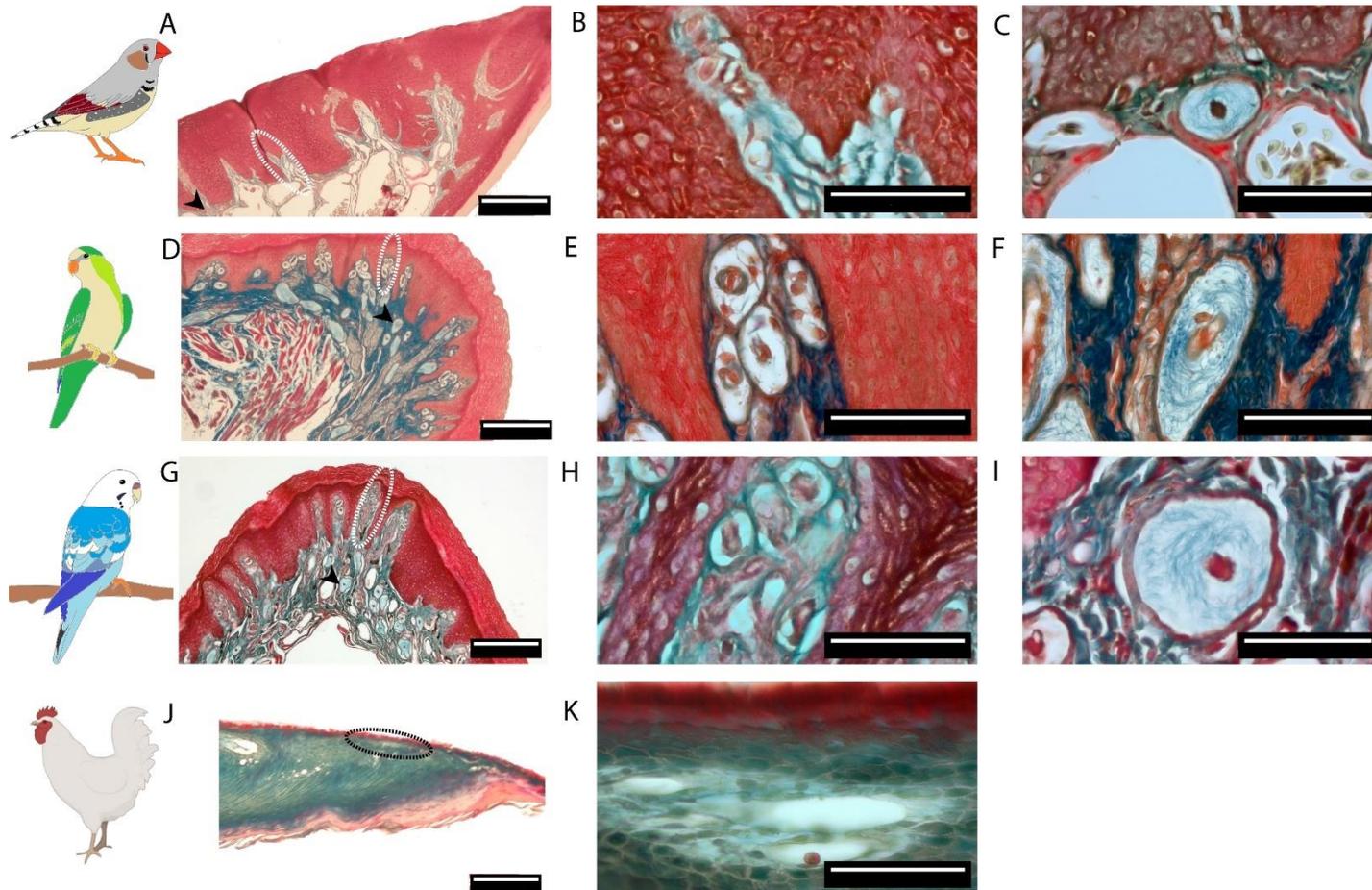
En la lengua del diamante mandarín, la tinción tricrómica de Masson permite distinguir una serie de papilas dérmicas, con matriz extracelular rica en colágeno, de forma alargada y puntiaguda (Fig. 5.A). En su porción apical, estas papilas presentan una marca similar a la de los grupos de órganos terminales de Grandry previamente descritos (Krulis, 1978; Wild, 1990), y en su base hay numerosos órganos terminales de Herbst, en concordancia con lo descrito para otras aves de la familia Estrildidae y también Fringillidae (Krulis, 1978; Wild, 1990) (Fig. 6 B-C).

En las dos especies de loros también se observan papilas dérmicas, un poco más anchas y menos puntiagudas que las del diamante (Fig 6D y 6G). La porción apical de las papilas de los loros contiene grandes y vistosos corpúsculos unicelulares de Grandry (Soliman & Madkour, 2017), y en la base,

a nivel de tejido conectivo se observan numerosos corpúsculos de Herbst (Fig. 6D-G).

La marca obtenida con el trazador AM1-43, por otra parte, revela con mayor detalle el componente neural del ápice de las papilas de las tres especies (Fig. 7). En el diamante mandarín, se observa una fuerte marca que devela claramente la morfología de las fibras que terminan en los corpúsculos de Grandry descritos por otros (Krulis, 1978; Wild, 1981). En fringílicos estrildidos, estos mecanorreceptores han sido denominados receptores de Merkel por Krulis, 1978. No obstante, su morfología coincide con los corpúsculos de Grandry (Gottschaldt, 1985), que como se mencionó más arriba, son similares a los corpúsculos de Meissner de mamíferos. Los corpúsculos de Herbst observados con la tinción de Masson, por otra parte, no emiten señal fluorescente, y su presencia se puede inferir en muchos casos por la silueta ausente de señal, especialmente en la transición entre la zona de la base y del ápice.

En el ápice de las papilas de los loros, hay una señal fluorescente similar a la del diamante, una fibra terminal que se enrolla formando un corpúsculo, siendo este menos denso y de morfología menos uniforme que la del diamante mandarín, sugiriendo que podría tratarse de una o unas cuantas fibras terminales que se asocian a los corpúsculos de Grandry unicelulares revelados con la tinción de Masson.



**Figura 6. Caracterización de los mecanorreceptores de Grandry y Herbst.** Fotomicrografías de campo claro de cortes sagitales del ápice de la lengua con tinción tricrómica de Masson. A, D, G y J vistas generales de cortes sagitales de lenguas. B, E y H corpúsculos de Grandry. C, F e I corpúsculos de Herbst. En óvalos blancos se marcaron las papilas, que contienen corpúsculos de Grandry. En óvalo negro estructuras vistas en *Gallus gallus*. En flechas negras se señalan a los corpúsculos de Herbst (barra escala de 250  $\mu$ m).

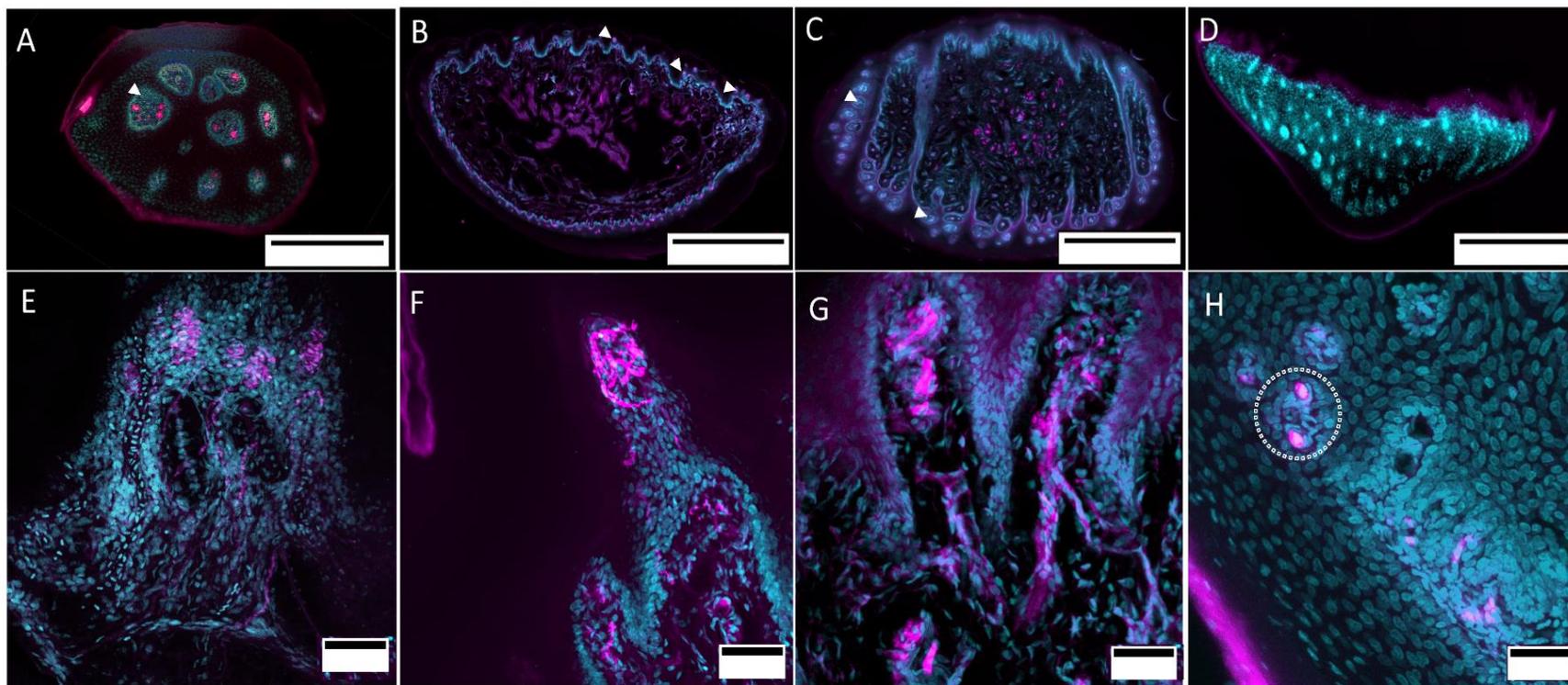
### **6.3 Número y distribución de papilas en las lenguas de las aves en estudio**

A partir de imágenes de microscopía confocal abarcando secciones a lo largo del eje z de secciones transversales seriadas de lengua de diamante, cata y cotorra, se realizó una estimación del número de papilas utilizando el método del fraccionador óptico, con la ayuda del software Stereoinvestigator ®, con el cual se generaron trazados de los contornos de las secciones y se marcó la posición de las papilas cuantificadas. En la lengua del diamante mandarín estimamos  $200 \pm 7$  papilas, en el periquito australiano  $450 \pm 30$ , y en la cotorra  $4535 \pm 80$ . (Tabla 1).

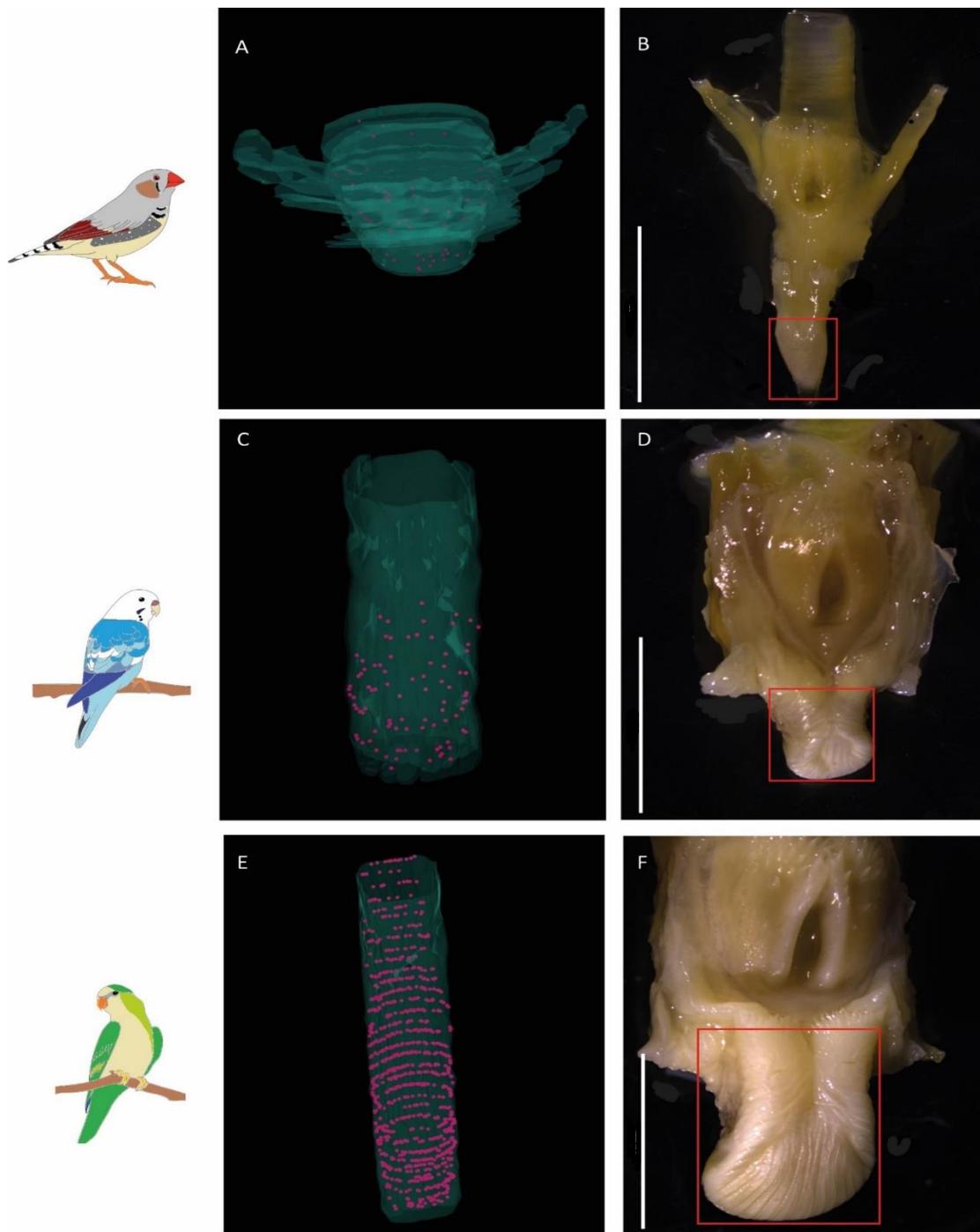
La diferencia entre la distribución de las papilas dérmicas de las lenguas de estas aves se puede visualizar en las reconstrucciones tridimensionales generadas a partir de los contornos realizados durante la cuantificación (Fig. 8). Mientras que en el periquito australiano las papilas táctiles se restringen a la parte anterior del cuerpo de la lengua y a su ápice, en la cotorra se observan numerosas papilas densamente distribuidas a lo largo de toda la lengua. En el diamante, las papilas se restringen al ápice y se puede apreciar a simple vista que, así como en el periquito, son menos densas que en la cotorra.

<b>Especie</b>	<b>Número total de papilas</b>	<b>Desviación estándar (del número total de papilas)</b>	<b>Promedio de número de papilas por sección de tejido</b>	<b>Desviación estándar de papilas por sección de tejido</b>	<b>Número de papilas/ área de la superficie de la lengua (mm<sup>2</sup>)</b>
<b>Diamante mandarín</b> ( <i>Taeniopygia guttata</i> )	200	7	3	2	3.48
<b>Periquito australiano</b> ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	450	30	8	5	56.17
<b>Cotorra Argentina</b> ( <i>Myiopsitta Monachus</i> )	4535	80	28	15	298.56

**Tabla 1. Estimación del número de papilas por especie.** Se midieron las lenguas desde la raíz hasta el ápice para tener una medición comparable entre especies por número de papilas, el cual fue estandarizado. Nótese que el cálculo de la desviación estándar se realizó basándose en un n=1 y en la cantidad de papilas por sección de tejido.



**Figura 7. Inyecciones del trazador AM1-43.** Fotomicrografías de confocal de cortes coronales del ápice de la lengua con fluorescencia. En color magenta se puede observar la marca del trazador fluorescente AM1-43 y en color cian una tinción de DAPI. Las flechas blancas marcan las estructuras (a modo de ejemplo) que fueron cuantificadas como papilas. A, B, C y D barra escala de 200  $\mu$ m. E, F, G y H barra escala 33  $\mu$ m.



**Figura 8. Reconstrucciones tridimensionales de lenguas que presentan papilas.** A) *Taeniopygia guttata*, C) *Melopsittacus undulatus*. E) *Myiopsitta monachus*. Todas las reconstrucciones fueron generadas a través del software Stereoinvestigator® y se muestran en orientación dorsal. Cada punto magenta representa un grupo de papilas contabilizadas en el ápice de la lengua. Las imágenes B, D y F son vistas dorsales de la lengua. Marcado en rojo se encuentra una referencia de la morfología y la dimensión de las reconstrucciones (barra escala de 1000  $\mu\text{m}$ ).

#### **6.4 Estimación de corpúsculos de Grandry y Herbst por papila de las aves en estudio**

Posteriormente a caracterizar los corpúsculos de Herbst y Grandry a través de técnicas de histología (tinción tricrómica de Masson), y de realizar un conteo de las papilas dérmicas de las lenguas de las aves que poseen estas estructuras, se procedió a cuantificar los mecanorreceptores existentes en las aves. El conteo se realizó utilizando el software Stereoinvestigator® y el estimador de Cavalieri (West et al., 1991). Debido a la dificultad que posee la técnica de cortes histológicos en parafina, se obtuvieron secciones de la zona media de la lengua en orientación sagital, donde se pueden apreciar los corpúsculos de Herbst y Grandry dentro de las estructuras descritas.

Se realizó un conteo para un  $n=1$  de 1 corte de parafina con tinción tricrómica de Masson para cada especie de ave. A continuación, se muestra el promedio de corpúsculos de Herbst y de Grandry por papila en cada una de las especies estudiadas que poseen esta estructura.

Con respecto a los resultados obtenidos que se muestran en la figura 9, estos se pueden explicar debido a la distribución que tienen los terminales encapsulados de mecanorreceptores en la lengua. Como se puede ver en las figuras 6 B-E y H, los corpúsculos de Grandry se organizan en grupos que forman estos complejos de papilas dérmicas, y en las bases de estas estructuras, encontramos algunos corpúsculos de Herbst. Estos también

conforman otros conglomerados de papilas compuestos exclusivamente por este tipo de terminal encapsulado.

Otra causa probable por la que la proporción promedio de estos terminales encapsulados sea diferente tiene que ver con el tamaño que poseen estos. En el caso de los corpúsculos de Grandry del diamante mandarín con un diámetro promedio de 44.5  $\mu\text{m}$ , estos son más pequeños que los del periquito australiano (promedio 87  $\mu\text{m}$ ) y la cotorra argentina (121  $\mu\text{m}$  en promedio).

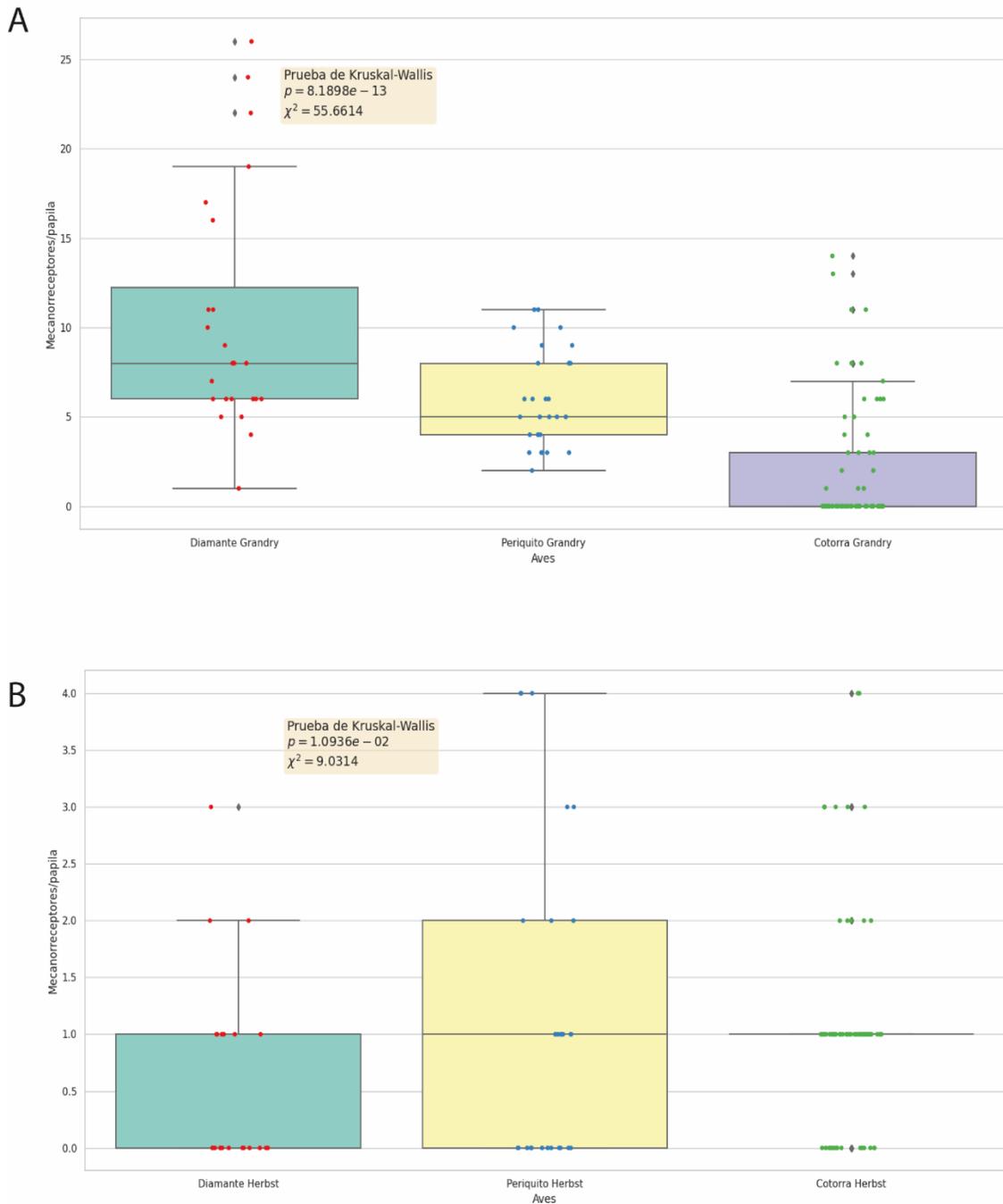
Cabe destacar (Figura 9) que, si bien existe una diferencia en la cantidad de corpúsculos de Grandry entre el periquito y la cotorra, también es evidente que hay una diferencia de tamaño de estos corpúsculos que explicaría porque el promedio por papila sería menor en el caso de la cotorra.

En el caso de los corpúsculos de Herbst en las 3 aves son una menor cantidad en promedio por papila, comparados con los corpúsculos de Grandry. En relación con el tamaño que estos poseen, los más pequeños corresponden a los del diamante mandarín, con un diámetro promedio de 135  $\mu\text{m}$ , luego los del periquito australiano con un diámetro promedio de 202  $\mu\text{m}$ . Los corpúsculos de Herbst de la cotorra argentina miden un diámetro promedio de 209  $\mu\text{m}$ , lo que no presenta una diferencia significativa en tamaño en comparación con el tamaño promedio de este tipo de corpúsculos en el periquito australiano.

Con respecto a los resultados expuestos en la figura 9, y los conteos de papilas estimativos de las especies en estudio (tabla 1) se puede realizar una estimación de la cantidad de cada tipo de corpúsculo (Herbst y Grandry) que podríamos encontrar en total en las aves. Los resultados se muestran en la tabla 2.

<b>Especie</b>	<b>Diámetro promedio corpúsculos de Grandry (µm)</b>	<b>Diámetro promedio corpúsculos de Herbst (µm)</b>
<b>Diamante mandarín</b> ( <i>Taeniopygia guttata</i> )	44.5± 13	135± 40
<b>Periquito australiano</b> ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	87± 18	202± 41
<b>Cotorra Argentina</b> ( <i>Myiopsitta monachus</i> )	121± 8	209± 86
<b>Prueba de Kruskal Wallis (valor de p)</b>	4,5 × 10 <sup>-8</sup>	0.024

**Tabla 2. Estimación del diámetro promedio de corpúsculos de Grandry y Herbst en las especies en estudio.** Al realizar la prueba de Kruskal Wallis para ambos tipos de mecanorreceptores, se obtienen valores de  $p < 0,05$ , lo que indicaría que estas poblaciones son distintas entre sí en diámetros.



**Figura 9. Corpúsculos de Herbst y de Grandry por papila de las aves en estudio.**

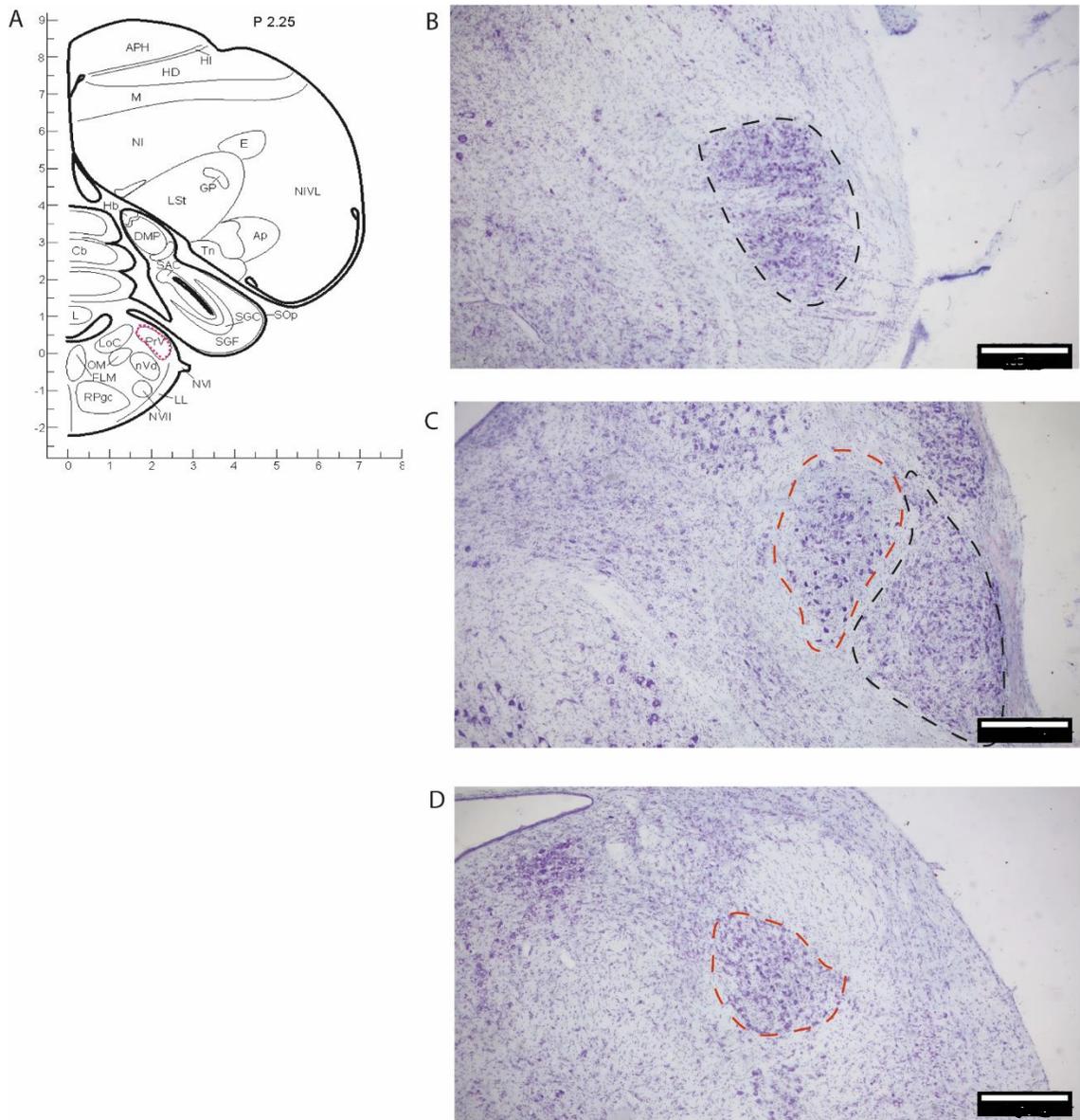
A) Representa la cantidad de los mecanorreceptores de Grandry cuantificados dentro de las papilas de las aves en estudio. B) Representa la cantidad de mecanorreceptores de Herbst cuantificados dentro de las papilas de las aves en estudio. Nótese que para ambos grupos de mecanorreceptores se realizó una prueba de Kruskal-Wallis, siendo el valor de  $p < 0.05$  en ambos casos. Esto indica que no existiría una equivalencia entre la cantidad de mecanorreceptores por papilas en las aves comparadas. En verde *Diamante mandarín*, en amarillo *Periquito australiano* y en morado *Cotorra argentina*.

<b>Especie</b>	<b>Número de papilas</b>	<b>Grandry promedio por papila</b>	<b>Grandry totales (estimación)</b>	<b>Herbst promedio por papila</b>	<b>Herbst totales (estimación)</b>
<b>Diamante mandarín</b> ( <i>Taeniopygia guttata</i> )	200±7	10±6	2000	0.5±0.8	100
<b>Periquito australiano</b> ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	450±30	6±3	2700	1±1	450
<b>Cotorra Argentina</b> ( <i>Myiopsitta monachus</i> )	4535±80	2±3	9070	1±1	4535

**Tabla 3. Estimación corpúsculos de Herbst y Grandry por especie.** Se aproximó a números enteros la cantidad promedio de mecanorreceptores según lo calculado en un conteo previo de mecanorreceptores por papila. Exceptuando, en el caso del Diamante mandarín. Mediciones realizadas para n=1.

### **6.5 Estimación de volúmenes relativos del trigémino principal**

Habiendo constatado diferencias en la cantidad de mecanorreceptores, nos propusimos medir los volúmenes del PrV de las especies de estudio para ver si el tamaño de este núcleo reflejaba dichas diferencias. Primero se procesaron las muestras de cerebro de las aves por medio de los métodos indicados en las secciones 5.5 y 5.7 para posteriormente realizar el procesamiento de las muestras en secciones de cortes teñidos con tinción de Nissl, por medio del software Stereoinvestigator®. Se utilizó un estimador de Cavalieri del mismo programa para poder realizar la estimación volumétrica, conociendo la distancia entre cortes de la región de interés, que en este caso fue la sección del PrV. Se midieron PrV lateral y medial para cada una de las especies en estudio. En la figura 10 se muestra una representación de la sección del PrV en cerebro de *Myiopsitta Monachus*.



**Figura 10. Medición del volumen trigeminal relativo en el PrV.** Fotomicrografías de secciones coronales del cerebro de *Myiopsitta monachus*. Todas las imágenes corresponden a tinción de Nissl (barra escala de 100 µm). A corresponde a sección coronal de referencia. En encuadre magenta, se destaca el PrV (Adaptado de Brauth et al., s. f.). B corresponde a PrV lateral (comienzo del PrV), C a PrV lateral (encuadre negro) y PrV medial (encuadre rojo) y D a PrV medial (término del PrV desde caudal a rostral).

Posterior a la medición del PrV medial y lateral, se procedió a realizar una estimación de su volumen para cada una de las especies en estudio. Se realizó también una relación del volumen del PrV con el peso del cerebro (en gramos)

de cada ejemplar. Los resultados se muestran en la tabla 4.

En concordancia con las diferencias en el número de órganos terminales mecanorreceptores, el volumen del PrV de la cotorra ( $2.02\text{mm}^3$ ) es mayor que en el periquito ( $0.03\text{mm}^3$ ), el diamante ( $0.019\text{mm}^3$ ) y el pollo ( $0.1\text{mm}^3$ ). Si bien el núcleo PrV recibe aferencias de todo el rostro, pico, cavidad oral, faringe y laringe, es posible que esta diferencia se deba en parte a la mayor cantidad de mecanorreceptores presentes en la lengua de la cotorra. Cabe destacar que el pollo, no presenta mecanorreceptores en la lengua (pero sí en el pico) (Niknafs et al., 2023) y no posee una diferencia notable de volumen de su PrV en comparación con las otras especies, exceptuando a la cotorra.

<b>Especie</b>	<b>Volumen promedio de PrV (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Peso del encéfalo (g)</b>	<b>Relación de volumen del PrV por peso del encéfalo (mm<sup>3</sup>/g)</b>
<b>Diamante mandarín</b> ( <i>Taeniopygia guttata</i> )	0.018	0.48	0.038
<b>Periquito australiano</b> ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	0.031	1.13	0.028
<b>Cotorra Argentina</b> ( <i>Myiopsitta Monachus</i> )	2.018	2.95	0.683
<b>Pollo</b> ( <i>Gallus gallus</i> )	0.098	1.73	0.056

**Tabla 4. Volúmenes del PrV relativos al peso del encéfalo para cada especie en estudio.** Mediciones fueron realizadas para n = 1.

### **6.6 Posibles botones gustativos en la lengua del pollo**

En el caso del pollo (*Gallus gallus*) no fue posible identificar estructuras corpusculares similares a las encontradas en las otras especies. Sin embargo, una estructura llama la atención y es posible visualizarla con tinción de hematoxilina eosina (ver sección materiales y métodos 5.6).

Como se puede observar en la figura 11, en la lengua del pollo se visualizan unas estructuras cuya morfología no es coincidente con las descritas como corpúsculos de Herbst ni de Grandry (ver figura 1b y 1d).

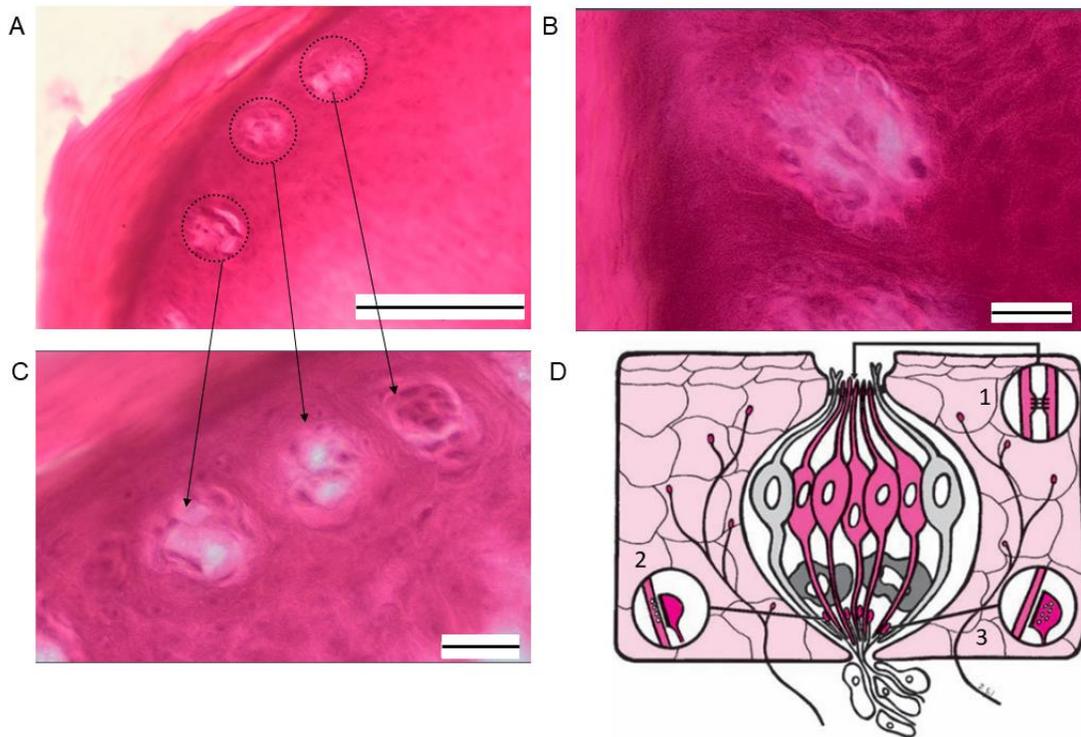
En la figura 10a se pueden observar las estructuras de interés. Con el propósito de poder más a detalle, se realizó una magnificación de 100X que muestra la estructura a profundidad. Morfológicamente esta estructura es muy similar a los botones gustativos que presentan los mamíferos, del cual se muestra un esquema en la figura 11D, por lo que preliminarmente podríamos comparar esta estructura con el botón gustativo.

En mamíferos los botones gustativos se componen de grupos de células epiteliales modificadas que se organizan en estructura de botón en la mucosa lingual (Gil-Loyzaga, 2006). Estos botones se encuentran dentro de las denominadas papilas gustativas, y su número de células varía según el tipo de papila gustativa (existen foliadas, filiformes, fungiformes y caliciformes).

Las fibras nerviosas mielínicas que inervan los botones gustativos forman plexos subepiteliales amielínicos, que alcanzan a muchos botones y a muchas células de cada botón (ver figura 11D). Las fibras que emergen libremente de estos plexos tienen tres destinos: entre los botones (fibras intergemales), alrededor de los mismos (fibras perigemales), o entran en ellos (fibras intragemales) (Gil-Loyzaga, 2006).

Estas estructuras se encuentran inervadas por fibras intragemales de dos tipos: las aferentes sensitivas gustativas y las eferentes moduladoras procedentes del tronco del encéfalo. Los plexos perigemales e intergemales corresponden a

eferentes simpáticos perivasculares y aferentes somatosensoriales (inervan los termorreceptores linguales) (Gil-Loyzaga, 2006).



**Figura 11. Potenciales botones gustativos de la lengua del pollo (*Gallus gallus*).** Fotomicrografía en campo claro con tinción de hematoxilina eosina de cortes sagitales del ápice de la lengua del pollo. B y C corresponden a aumentos de las zonas de interés. En las circunferencias punteadas se encuentran marcadas las estructuras. A, B y C barra escala de 100  $\mu$ m. D corresponde a esquema de los botones gustativos de mamíferos que muestra una morfología similar. Células claras e intermedias (rojo) en el centro del botón, rodeadas por células oscuras (gris claro). En el ápex de cada célula se observa contacto con las vecinas (1). Las células basales están en la base del botón (gris oscuro). Las fibras perigemales (negras con terminal en rojo) están en la mucosa lingual (rosa). Las fibras nerviosas intragemales aferentes (2) o eferentes (3) contactan las células. D Modificado de Gil-Loyzaga, 2006.

## 7. DISCUSIÓN

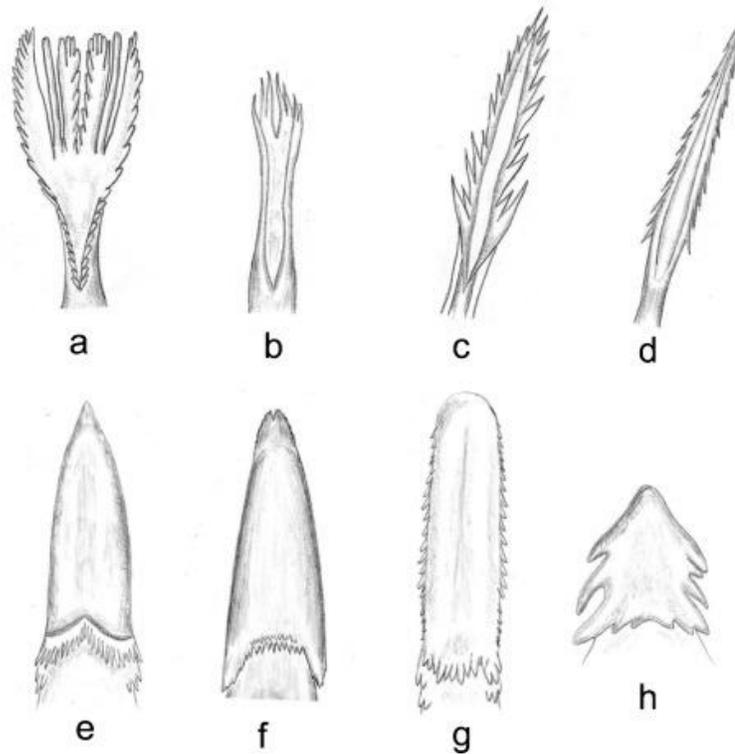
Nuestros resultados muestran una interesante diversidad en la anatomía, morfología, abundancia y distribución de los corpúsculos de Herbst y Grandry en la lengua de las aves que fueron estudiadas. En el paserino y los psitácidos estudiados, encontramos diferentes cantidades de papilas táctiles que, si bien tienen forma, número y distribución disímiles, conservan una organización general común, consistente en la acumulación de corpúsculos de Herbst en su base y corpúsculos de Grandry en el ápice. Esto contrasta con lo observado en el pollo, donde no existen papilas semejantes, pero sí putativos botones gustativos.

También existen diferencias en el volumen del PrV, el principal blanco de los receptores linguales. La cotorra argentina, la especie con el mayor número de papilas táctiles, presenta también el mayor tamaño relativo de este núcleo, mientras que en las otras aves no se observan diferencias significativas en los volúmenes medidos (Ver tabla 2.). Futuros estudios de trazado podrán aclarar en qué medida estas diferencias en el tamaño de PrV se deben a las diferencias en las proyecciones linguales.

### **7.1 Morfología de la lengua, tejidos que la componen y su relación con los grados de manipulación.**

Las adaptaciones para alimentarse son una característica muy importante en la evolución de las aves (Howe, 1984). Previamente, se conocía que las adaptaciones para la alimentación dependían de cambios morfométricos que experimentan las aves en la estructura del pico y las patas a lo largo de procesos evolutivos (Colorado Z., 2004). Otros estudios similares han existido también con respecto a los cambios morfológicos que existen en las lenguas especializadas de aves como los picaflones (Paton & Collins, 1989).

Investigaciones más recientes, como los de Erdogan & Iwasaki (2014) han permitido visualizar una comparación morfológica más exhaustiva, separando a algunos grupos de aves según la forma de sus lenguas, las que se muestran en la figura 12.



**Figura 12. Morfología de las lenguas de aves.** Adaptado de Erdoğan e Iwasaki, 2014. (a) Lengua en forma de cepillo o franja (aves nectarívoras ,pájaros carpinteros-Passeriformes), (b) Lengua en forma de tubo (aves nectarívoras, Zosteropidae), (c) Lengua en forma de tubo y cepillo (córvidos-Passeriformes), (d) lengua en forma de lanceta (pájaros carpinteros-Piciformes), (e) lengua en forma de daga o triangular (pollos-Galliformes), (f) ápice bifido en la lengua (urracas-Passeriformes), (g) lengua ovalada (gansos-Anseriformes), (h) lengua en forma de estrella (emúes-Struthioniformes).

En ausencia de dientes, labios y mejillas con músculos, el pico y la lengua se han convertido en órganos fundamentales para la manipulación de objetos y alimentos (Colorado Z., 2004; Erdoğan & Iwasaki, 2014; Howe, 1984). Esto, podría ser una de las causas por las que existen diferentes morfologías de lenguas que se relacionarían de alguna forma con el modo de vida del ave.

En el caso de los resultados obtenidos a través de esta tesis, sería necesario agregar el modelo de lengua carnosa que tienen aves psitaciformes como las

que hemos incluido en este estudio (*Melopsittacus undulatus* y *Myiopsitta monachus*). Esto queda en evidencia al observar la figura 4, donde existen claras diferencias en la morfología en el caso de las familias de aves en estudio tal como se muestra en la figura 12. Esto nos lleva a preguntarnos si es que la morfología se relaciona también con la abundancia y distribución de los mecanorreceptores en estudio.

La lengua consta de varios elementos que se influyen mecánicamente entre sí, como elementos esqueléticos cartilagosos y óseos, músculos y glándulas salivales (Homberger & Meyers, 1989). Estos elementos fueron encontrados en las lenguas de las aves en estudio, e independientemente de la morfología existente, permanecen constantes, lo cual se puede evidenciar en la figura 5.

Existen algunas diferencias con respecto al grosor de capas de queratina en las lenguas, que podrían relacionarse con la protección de este tejido según el tipo de manipulación que realiza. En el caso de *Myiopsitta monachus* (ver figura 5C) se ve una amplia capa queratinosa, una amplia capa de epitelio y de tejido conectivo, además de musculatura intrínseca (Ver figura 5D). Esta capa de queratina gruesa sugiere que existe una relación entre el grosor de esta con el modo de vida del ave debido a los movimientos bruscos que presentan con la cavidad oral, al cortar y doblar ramas en la construcción de sus nidos (Bucher et al., 1990) . En el caso de aves que manipulan menos con la cavidad oral, como el pollo, presenta una capa de queratina delgada y no posee una lengua

carnosa como se ve el resto de las aves estudiadas (figura 4), sino que presenta una morfología aplanada, similar a la que se muestra en la figura 12e. Esta forma, le confiere a la lengua un mayor grado de dureza, a diferencia de las lenguas que son carnosas como las de los psitácidos y passeriformes.

## **7.2 Identificación y caracterización de los terminales encapsulados de mecanorreceptores**

Luego de comparar las morfologías y niveles de tejido presentes en las lenguas de las aves de este estudio, se procedió a identificar y caracterizar a los corpúsculos de Herbst y de Grandry presentes en los ápices de las lenguas.

Previamente, contábamos con la caracterización de la lengua del diamante mandarín, realizada por Wild, 1990. En esta investigación, se describieron estructuras presentes a nivel del epitelio y tejido conectivo de la lengua, en que se podían distinguir agrupaciones celulares morfológicamente comparables con papilas dérmicas, debido a la presencia de corpúsculos de Herbst y Grandry. En trabajos previos (Wild, 1990) también se menciona la presencia de corpúsculos de Merkel, llamados así previamente por Krulis, 1978. Si bien, es sabido que los corpúsculos de Grandry comparten algunas características citológicas con los de Merkel (Gottschaldt, 1985), no existe una similitud morfológica que nos permita indicar que estos fueran análogos con los corpúsculos de Grandry, como sucede en el caso de la comparación morfológica entre éstos y los corpúsculos de Meissner (ver figura 1), donde también es coincidente el tipo de

tejido en dónde se sitúan. Si bien, se ha descrito que los corpúsculos de Merkel se pueden encontrar en la base de las papilas dérmicas en el caso de los mamíferos, en el caso de las aves, en la base de estas, y en el tejido conectivo, encontramos a los corpúsculos de Herbst (figura 5).

Estos últimos coinciden tamaño y morfología con las descripciones previas de estos realizadas por Wild, 1990 y por Bubiën-Waluszewska (1979). Es por ello por lo que se puede confirmar en primera instancia según el criterio histológico que los mecanorreceptores de Herbst y Grandry corresponden a los elementos analizados.

### **7.3 Abundancia y distribución de los corpúsculos de Herbst y Grandry**

Luego de la identificación y caracterización de los terminales encapsulados de mecanorreceptores presentes en el ápice de las lenguas en estudio, se procedió a comprobar si es que existían diferencias dentro de los grupos en estudio. Primero se realizó una cuantificación de las papilas dérmicas de terminales encapsulados de mecanorreceptores para así tener una estimación de la distribución y abundancia de estas estructuras. Posteriormente se procedió a cuantificar el número de corpúsculos de Herbst y Grandry dentro de las papilas dérmicas.

Nuestros análisis, sugieren una tendencia de cantidad de papilas, de terminales mecanosensitivos encapsulados y de su tamaño. Sin embargo, fueron

realizadas en poblaciones muy pequeñas ( $n=1$ ) por lo que estas cuantificaciones son meramente estimativas.

Sin embargo, nuestros resultados preliminares sugieren que en la cotorra argentina las papilas táctiles se distribuyen a lo largo de toda la lengua, y que son más numerosas que en el periquito australiano y el diamante mandarín, donde las papilas se limitan al ápice y la parte distal del cuerpo de la lengua. En la lengua del pollo, en cambio, no se exhiben estructuras similares a las vistas en passerinos y psitácidos, ni con las técnicas de histología, ni con las inyecciones del trazador AM1-43.

Ahora si analizamos a los terminales mecanosensitivos encapsulados desde la perspectiva de su promedio por papila y de su tamaño, nuestros resultados sugieren que en el caso de diamante mandarín su proporción de corpúsculos de Grandry es mayor que la de corpúsculos de Herbst. Otro detalle interesante tiene que ver con el tamaño de los primeros ( $44.5 \mu\text{m}$  de diámetro en promedio) y su cantidad por papila.

En los psitácidos analizados, se han encontrado notables diferencias en su cantidad de papilas (periquito australiano 450 y cotorra argentina 4535) y en el tamaño de sus corpúsculos de Grandry, más no de los corpúsculos de Herbst. Los corpúsculos de Grandry del periquito australiano, son de un menor diámetro promedio ( $87 \mu\text{m}$ ) que los de la cotorra argentina ( $121 \mu\text{m}$ ) y los corpúsculos de Herbst tienen un diámetro promedio de  $202 \mu\text{m}$  en el periquito australiano y  $209 \mu\text{m}$  en la cotorra argentina. En el caso del diamante mandarín los corpúsculos

de Herbst presentan un tamaño menor que al de los psitácidos (135  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio).

Estos resultados nos sugieren que la cotorra argentina posee una capacidad de discriminación táctil más refinada en comparación con las otras aves involucradas en este estudio, debido a que posee mayor densidad de papilas y un mayor número de terminales mecanosensibles encapsulados. Específicamente, la elevada concentración de papilas sensoriales y su amplia distribución a lo largo de la lengua, sugiere una notable capacidad de discriminación táctil en comparación con las demás aves estudiadas, asumiendo que cada papila actúa como una unidad sensorial.

En contraste, el diamante exhibe una situación opuesta a la de la cotorra, ya que presenta receptores de menor tamaño y una menor cantidad de papilas, que se encuentran concentradas sólo en el ápice de su lengua. Esto sugiere que la capacidad de discriminación táctil del diamante debería ser significativamente inferior a la de la cotorra.

En el caso del periquito australiano, a pesar de tener significativamente más papilas que el diamante mandarín, se observa una considerable disparidad en comparación con la cotorra argentina en términos de cantidad. Este escenario se presenta como un caso intermedio en comparación a las aves anteriormente mencionadas, en lo que respecta a la discriminación táctil, especialmente al comparar numéricamente el tamaño promedio de sus mecanorreceptores y la proporción de estos en cada papila.

Estas diferencias podrían relacionarse con el nivel de manipulación de objetos que estas especies realizan utilizando la lengua. Si bien las tres especies que presentan terminales mecanorreceptores utilizan la lengua y el pico para pelar semillas, difieren en otras conductas. El diamante mandarín acostumbra a crear nidos relativamente simples a partir de diversos tipos de material, el cual se dispone en concavidades sin formar un entramado fino (Muth & Healy, 2014). El periquito australiano, como la mayoría de los loros, no construye nidos, sino que anida en cavidades que encuentra en árboles (Wyndham, 1980). En cambio, la cotorra argentina, es de los pocos loros que construyen nidos, los cuales consisten en elaborados entramados de ramas que forman cámaras, y que además suelen ser construidos en conjuntos por varias parejas que conforman un clan, llegando a generar grandes “edificios”. Tanto los periquitos como las cotorras, además, suelen usar el pico y la lengua para trepar, utilizando el órgano bucal como un tercer apéndice. Los loros además suelen acicalarse con el pico y la lengua como parte de sus interacciones sociales. El pollo, en cambio, fuera de picotear para recoger alimentos desde el suelo, y a continuación tragarlos sin manipularlos mayormente en la cavidad oral, no realiza manipulación de objetos con el aparato bucal. Así, el animal que exhibe las conductas más complejas de manipulación de objetos, la cotorra argentina, es también la que posee una mayor cantidad de papilas táctiles en su lengua, y la que exhibe menos de estas conductas, el pollo, no posee ninguna.

#### **7.4 Relación del volumen relativo del PrV con respecto a la representación en la lengua de las aves en estudio**

Con el objetivo de establecer si existían diferencias significativas del volumen del PrV entre ejemplares que presentan terminales encapsulados de mecanorreceptores y entre quienes no los presentan, se procedió a medir los volúmenes del PrV, uno de los principales blancos de las fibras mecanorreceptoras de la lengua.

Es importante mencionar que al estimar el volumen completo de PrV, se incluyen regiones que reciben aferencias táctiles no sólo de la lengua, sino que también del pico (que en todas las aves suele tener mecanorreceptores), el resto del rostro, la cavidad oral y nasal, la faringe y la laringe. Es por esto por lo que para poder explorar con mejor detalle las posibles diferencias en la representación de la lengua en el bulbo raquídeo, será importante en el futuro trazar las proyecciones con trazadores neuronales para poder compararlas específicamente. En aves como las psitácidas, se sabía previamente que la aumentada representación del PrV podría estar relacionada como una compensación con respecto al desarrollo del sentido de la visión, que en caso de estas aves es muy lateralizada (Gutiérrez-Ibáñez et al., 2009).

## 7.5 Potenciales botones gustativos en el pollo

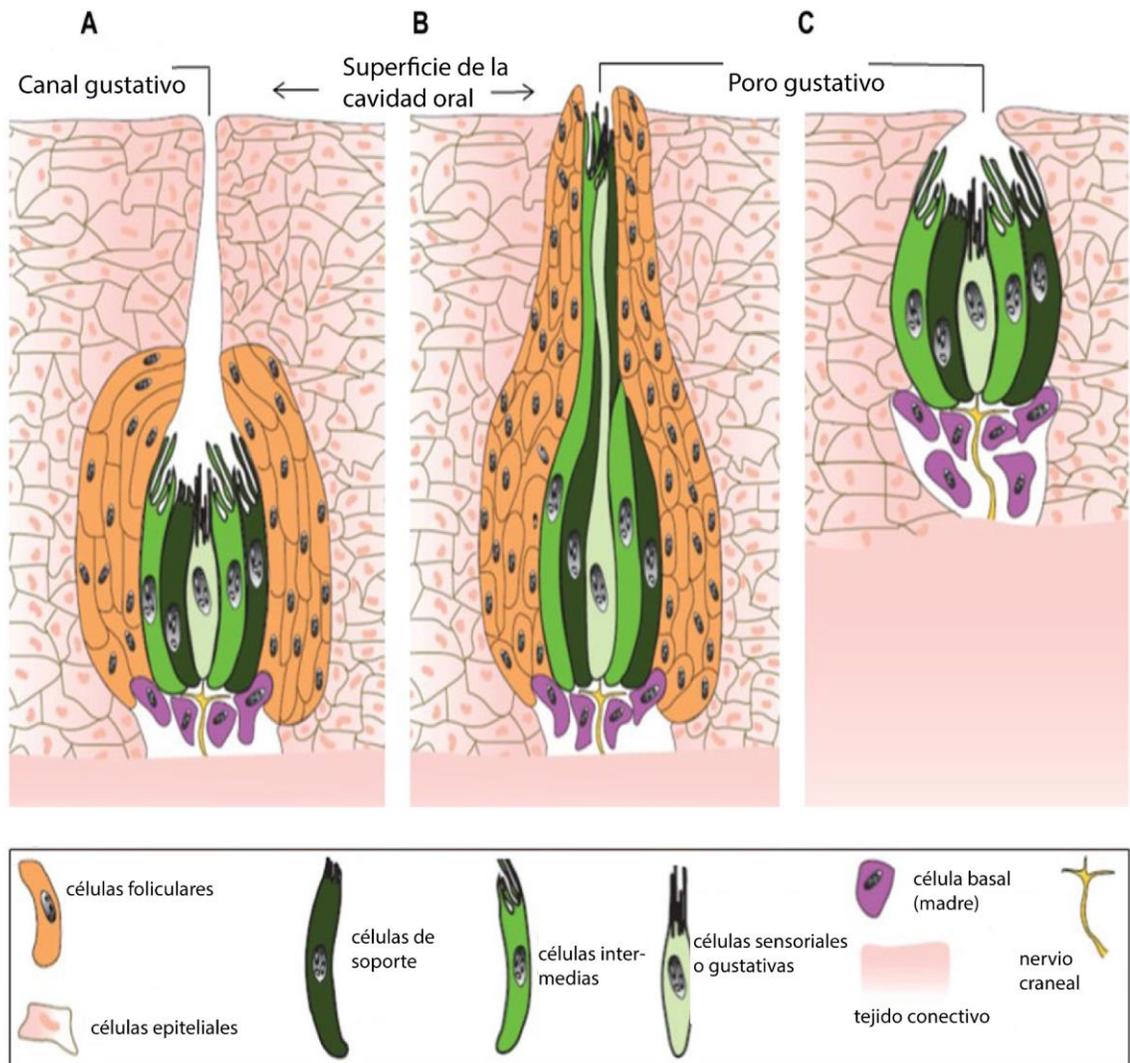
En el caso del Pollo (*Gallus gallus*) no fue posible caracterizar morfológicamente a las estructuras presentes en su lengua como corpúsculos de Herbst o de Grandry. No obstante, fue hallada una estructura que presenta similitudes morfológicas con los botones gustativos, que dan lugar a las papilas gustativas en el caso de los mamíferos (Figura 11).

La morfología y las inyecciones del trazador neuronal AM1-43 ponen en evidencia que esta estructura puede ser sensorial. Un estudio reciente de Niknafs et al., 2023 que muestra que estas estructuras serían potencialmente botones gustativos. Esto debido a que el análisis del genoma del pollo reveló un repertorio completo de genes receptores del gusto (TR), pero también la falta del receptor del sabor dulce con el que cuentan los mamíferos llamado T1R2 y un número menor de receptores del sabor amargo (T2R), que consta de solo tres miembros en comparación con los 25 de los humanos (Niknafs et al., 2023).

Con respecto a la anatomía previamente conocida de la cavidad oral del pollo, se ha descrito que estos botones gustativos y estructuras de papilas gustativas como tal no se encuentran distribuidas en la lengua, si no que en otras zonas como el paladar (Ganchrow & Ganchrow, 1985). Pero en el caso de nuestros resultados, se encuentran en el ápice de la lengua, en el tejido conectivo.

Otras investigaciones demuestran que las papilas gustativas aparecen en grupos alrededor de los conductos salivales, como se ha demostrado en muchas especies de aves, como el pollo, el gorrión, el martín pescador, el búho moteado, el halcón paloma, el correlimos occidental, el correlimos común y el loro (Elner et al., 2005; Nivritti Nalavade & Tanasen Varute, 1977). En el caso de nuestros análisis, la histología realizada no nos permitió identificar conductos salivales, por lo que faltaría un análisis más completo para determinar si es que estos existen en la lengua de *Gallus gallus*. (Niknafs et al., 2023) describen 3 tipos de papilas gustativas presentes en aves, modelos que realizaron a partir de las descripciones realizadas por (Bath, 1906) y (Rowland et al., 2015).

En la figura 12(c) se muestra una morfología de botón gustativo que es muy similar a la observada en la figura 11. Si bien, esto nos daría un claro indicio de que esta estructura pudiese ser un botón gustativo, es necesario realizar análisis futuros para estudiar el nivel de respuesta de las células que forman al potencial botón gustativo.



**Figura 13. Tipos de papilas gustativas en aves.** (A) El Tipo I es una papila gustativa ovoide envuelta por células foliculares. (B) El tipo II tiene forma alargada. (C) El tipo III no tiene células foliculares. Adaptado de (Niknafs et al., 2023).

## 8. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se concluye que:

- Si bien, las lenguas comparten la organización de sus tejidos (capa de queratina, tejido epitelial, tejido conectivo, presencia de estructuras cartilaginosas) la composición histológica de estos tejidos varía según el modo de vida del animal y también con el grado de manipulación que ejercen éstas con este órgano. En particular el grosor de las capas de queratina.
- Los mecanorreceptores de Grandry y Herbst existen en las lenguas de aves que presentan grados de manipulación con su lengua (diamante, periquito australiano y cotorra argentina) y ausentes en un ave que utiliza relativamente poco la lengua (el pollo). De nuestra muestra, además, el ave que presenta conductas más complejas de manipulación con el aparato bucal, la cotorra argentina, presenta una cantidad mayor de papilas táctiles que las otras especies, así como una distribución más extendida a través de la lengua. Dentro de los psitácidos analizados (*Melopsittacus undulatus* y *Myiopsitta monachus*), existen evidentes diferencias en cuanto a su morfología del ápice lingual, además de la distribución de los corpúsculos de Herbst y de Grandry. Cabe mencionar que, si bien ambas presentan estructuras papilares donde se concentran estos terminales encapsulados, estos tienen organizaciones diferentes,

no obstante, es conservado el nivel de tejido en el que se encuentran (en tejido epitelial corpúsculos de Grandry y corpúsculos de Herbst en tejido conectivo). Lo mismo se puede analizar en el caso del ave paserina incluida dentro de este estudio, que presenta a los corpúsculos en los mismos niveles de tejido.

- Con respecto al promedio de terminales mecanosensibles encapsulados por papila en las aves objeto de estudio, se observan disparidades en la proporción de estos en el diamante mandarín, quien posee en promedio 10 corpúsculos de Grandry por cada 0.5 corpúsculos de Herbst. En contraste, en la cotorra argentina, un ave que presenta la mayor cantidad de papilas cuantificadas en este estudio, se evidencia una proporción menos dispar en el promedio de los terminales mecanosensibles encapsulados por papila (2 corpúsculos de Grandry por cada 1 corpúsculo de Herbst en promedio por papila). Esto sugiere una distribución más homogénea de los dos tipos de terminales mecanosensibles encapsulados a lo largo de este órgano.
- En lo que respecta al tamaño de los terminales mecanosensibles encapsulados, el ave que presenta corpúsculos más grandes y distribuidos extensamente a lo largo de la lengua, tal como se observa en la cotorra argentina, podría exhibir una discriminación táctil más avanzada en comparación con otras aves objeto de estudio. En contraste, en aves que cuentan con corpúsculos más pequeños y una

cantidad significativamente menor de papilas, como en el caso del diamante mandarín, se sugeriría una capacidad de discriminación táctil notablemente inferior en comparación con la cotorra. Un caso intermedio entre estas dos aves mencionadas sería el del periquito australiano, que si bien presenta una disparidad en el tamaño de sus mecanorreceptores, tiene un número notablemente inferior de papilas con respecto a la cotorra argentina, además de una distribución principalmente en el ápice de esta estructura similar a la distribución que presenta el diamante mandarín.

- Aves que no manipulan alimentos con su lengua, como es el caso del pollo, no poseen terminales encapsulados de mecanorreceptores, no obstante, existen otras estructuras similares a botones gustativos.
- La cotorra argentina, además de poseer un número mayor de papilas táctiles que los periquitos y el diamante, presenta un mayor volumen del núcleo PrV. No obstante, la representación volumétrica medida en relación con el peso del cerebro no es suficiente para estimar cambios en la representación somatosensorial de la lengua, por lo que futuramente se espera realizar trazado neuronal para abordar esta problemática.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Bath, W. (1906). *Die Geschmacksorgane der Vögel und Krokodile*. 1, 1-47.
- Bottjer, S. W., & Arnold, A. P. (1982). Afferent neurons in the hypoglossal nerve of the zebra finch (*Poephila guttata*): Localization with horseradish peroxidase. *Journal of Comparative Neurology*, 210(2), 190-197.  
<https://doi.org/10.1002/cne.902100209>
- Bottjer, S. W., & To, M. (2012). Afferents from Vocal Motor and Respiratory Effectors Are Recruited during Vocal Production in Juvenile Songbirds. *The Journal of Neuroscience*, 32(32), 10895-10906.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0990-12.2012>
- Brauth, S., Heaton, J., Roberts, T., & Liang, W. (s.f.). *Budgerigar Brain Atlas*. Recuperado 20 de marzo de 2024, de <http://www.brauthlab.umd.edu/atlas.htm>
- Brzęk, P., Lessner, K. M., Caviedes-Vidal, E., & Karasov, W. H. (2010). Low plasticity in digestive physiology constrains feeding ecology in diet specialist, zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Journal of Experimental Biology*, 213(5), 798-807. <https://doi.org/10.1242/jeb.037259>
- Bubien-Waluszewska. (1979). Cranial Nerves. En A. King & J. Mclelland (Eds.), *Form and Function in birds* (pp. 385-438).
- Bucher, E. H., Martin, L. F., Martella, M. B., & Navarro, J. L. (1990). *SOCIAL BEHAVIOUR AND POPULATION DYNAMICS OF THE MONK*

*PARAKEET.*

Carson, F. L., & Cappellano, C. H. (2015). *Histotechnology: A Self Instructional Text.*

Colorado Z., G. (2004). *RELACIÓN DE LA MORFOMETRÍA DE AVES CON GREMIOS ALIMENTICIOS.*

Demery, Z. P., Chappell, J., & Martin, G. R. (2011). Vision, touch and object manipulation in Senegal parrots *Poicephalus senegalus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1725), 3687-3693. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0374>

Dubbeldam, J. L., Brus, E. R., Menken, S. B. J., & Zeilstra, S. (1979). The central projections of the glossopharyngeal and vagus ganglia in the mallard, *Anas platyrhynchos* L. *Journal of Comparative Neurology*, 183(1), 149-168. <https://doi.org/10.1002/cne.901830111>

Elnor, R. W., Beninger, P. G., Jackson, D. L., & Potter, T. M. (2005). Evidence of a new feeding mode in western sandpiper (*Calidris mauri*) and dunlin (*Calidris alpina*) based on bill and tongue morphology and ultrastructure. *Marine Biology*, 146(6), 1223-1234. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1521-5>

Erdoğan, S., & Iwasaki, S. (2014). Function-related morphological characteristics and specialized structures of the avian tongue. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 196(2-3), 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2013.09.005>

Faunes, M., & Wild, J. M. (2017). The sensory trigeminal complex and the

- organization of its primary afferents in the zebra finch ( *Taeniopygia guttata* ). *Journal of Comparative Neurology*, 525(13), 2820-2831. <https://doi.org/10.1002/cne.24249>
- Ganchrow, D., & Ganchrow, J. R. (1985). Number and distribution of taste buds in the oral cavity of hatchling chicks. *Physiology & Behavior*, 34(6), 889-894. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(85\)90009-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(85)90009-5)
- Gil-Loyzaga, P. (2006). Fisiología del receptor y la vía gustativa. En *Fisiología Humana* (pp. 254-261).
- Gottschaldt, K. M. (1985). Structure and function of somatosensory receptors in birds. En A. King & J. Mclelland (Eds.), *Form and function in birds* (pp. 375-462).
- Gutiérrez-Ibáñez, C., Iwaniuk, A. N., & Wylie, D. R. (2009). The Independent Evolution of the Enlargement of the Principal Sensory Nucleus of the Trigeminal Nerve in Three Different Groups of Birds. *Brain, Behavior and Evolution*, 74(4), 280-294. <https://doi.org/10.1159/000270904>
- Homberger, D. G., & Meyers, R. A. (1989). Morphology of the lingual apparatus of the domestic chicken, *Gallus gallus* , with special attention to the structure of the fasciae. *American Journal of Anatomy*, 186(3), 217-257. <https://doi.org/10.1002/aja.1001860302>
- Howe, H. F. (1984). Constraints on the Evolution of Mutualisms. *The American Naturalist*, 123(6), 764-777.
- Iheanacho, F., & Vellipuram, A. R. (2023). Physiology, Mechanoreceptors. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541068/>

- Ikeda, R., Cha, M., Ling, J., Jia, Z., Coyle, D., & Gu, J. G. (2014). Merkel Cells Transduce and Encode Tactile Stimuli to Drive A $\beta$ -Afferent Impulses. *Cell*, 157(3), 664-675. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.026>
- Iwasaki, S., Asami, T., & Chiba, A. (1997). Ultrastructural study of the keratinization of the dorsal epithelium of the tongue of Middendorff's bean goose, *Anser fabalis middendorffii* (Anseres, Antidae). *The Anatomical Record*, 247(2), 149-163. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199702\)247:2<149::AID-AR1>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199702)247:2<149::AID-AR1>3.0.CO;2-T)
- Johnston, N. E. (2014). *The avian tongue*. Golden Gate Audubon Society, San Francisco, CA.
- Juniper, T., Parr, M., & Franklin, K. (1998). *Parrots: A Guide to Parrots of the World*. Yale University Press.
- Koenig, H. E., Korb, R., Liebich, H. G., & Klupiec, C. (2016). *Avian anatomy: Textbook and colour atlas* (5m ed.). Books Ltd.
- Krulis, V. (1978). *Struktur und Verteilung von Tastrezeptoren im Schnabel-Zungenbereich von Singvögeln, im besondern der Fringillidae*. 85, 385-447.
- Mackiewicz, P., Urantówka, A. D., Krocak, A., & Mackiewicz, D. (2019). Resolving Phylogenetic Relationships within Passeriformes Based on Mitochondrial Genes and Inferring the Evolution of Their Mitogenomes in Terms of Duplications. *Genome Biology and Evolution*, 11(10), 2824-2849. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz209>

- Mazzoni, D., Pascual, J., Arroyo, L., Tomas, M., González-Solís, J., & Senar, J. C. (2022). The diet of Monk Parakeet *Myiopsitta monachus* nestlings in an urban area: A study using stable isotopes. *Bird Study*, *68*, 1-7. <https://doi.org/10.1080/00063657.2022.2113856>
- Meyers, J. R., MacDonald, R. B., Duggan, A., Lenzi, D., Standaert, D. G., Corwin, J. T., & Corey, D. P. (2003). Lighting up the Senses: FM1-43 Loading of Sensory Cells through Nonselective Ion Channels. *The Journal of Neuroscience*, *23*(10), 4054-4065. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-10-04054.2003>
- Mielke, M., & Van Wassenbergh, S. (2022). Three-dimensional movement of the beak during seed processing in domestic canaries. *Journal of Experimental Biology*, *225*(14), jeb244360. <https://doi.org/10.1242/jeb.244360>
- Muth, F., & Healy, S. D. (2014). Zebra finches select nest material appropriate for a building task. *Animal Behaviour*, *90*, 237-244. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.02.008>
- Nieuwenhuys, R., & Van Huijzen, C. (2007). *General sensory systems and taste in the human central nervous system: A synopsis and atlas*. Springer Science & Business.
- Niknafs, S., Navarro, M., Schneider, E. R., & Roura, E. (2023). The avian taste system. *Frontiers in Physiology*, *14*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2023.1235377>
- Nishikawa, S. (2011). Fluorescent AM1-43 and FM1-43 probes for dental

- sensory nerves and cells: Their labeling mechanisms and applications. *Japanese Dental Science Review*, 47(2), 150-156.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2010.12.003>
- Nivritti Nalavade, M., & Tanasen Varute, A. (1977). Histochemical studies on the mucins of the vertebrate tongues. *Acta Histochemica*, 60(1), 18-31.  
[https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(77\)80020-2](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(77)80020-2)
- Paton, D. C., & Collins, B. G. (1989). Bills and tongues of nectar-feeding birds: A review of morphology, function and performance, with intercontinental comparisons. *Australian Journal of Ecology*, 14(4), 473-506.  
<https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1989.tb01457.x>
- Piccinin, M. A., Miao, J. H., & Schwartz, J. (2023). Histology, Meissner Corpuscle. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518980/>
- Quindlen, J. C., Stolarski, H. K., Johnson, M. D., & Barocas, V. H. (2016). A multiphysics model of the Pacinian corpuscle. *Integrative Biology*, 8(11), 1111-1125. <https://doi.org/10.1039/C6IB00157B>
- Rowland, H. M., Rockwell Parker, M., Jiang, P., Reed, D. R., & Beauchamp, G. K. (2015). Comparative Taste Biology with Special Focus on Birds and Reptiles. En R. L. Doty (Ed.), *Handbook of Olfaction and Gustation* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 957-982). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118971758.ch43>
- Santos Vidal, S. (2017). *Tinción Hematoxilina-Eosina*. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Orgánica y Bio-Orgánica.; Master Thesis.
- Schneider, E. R., Gracheva, E. O., & Bagriantsev, S. N. (2016). Evolutionary

- Specialization of Tactile Perception in Vertebrates. *Physiology*, 31(3), 193-200. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2015>
- Slater, P. J. B., & Ollason, J. C. (1972). The Temporal Pattern of Behaviour in Isolated Male Zebra Finches: Transition Analysis. *Behaviour*, 42(3-4), 248-268. <https://doi.org/10.1163/156853972X00293>
- Soliman, S. A., & Madkour, F. A. (2017). *A comparative analysis of the organization of the sensory units in the beak of duck and quail*.
- Striedter, G. F., & Northcutt, R. G. (2019). Evolution of the cranial nerves. En *Brains Through Time: A Natural History of Vertebrates*. Oxford University Press.
- Toyoshima, K. (1989). *Chemoreceptive and mechanoreceptive paraneurons in the tongue*. 52, 383-388.
- Vega, J. A., García-Suárez, O., Montaña, J. A., Pardo, B., & Cobo, J. M. (2009). The Meissner and Pacinian sensory corpuscles revisited new data from the last decade. *Microscopy Research and Technique*, 72(4), 299-309. <https://doi.org/10.1002/jemt.20651>
- Verendeev, A., Thomas, C., McFarlin, S. C., Hopkins, W. D., Phillips, K. A., & Sherwood, C. C. (2015). Comparative analysis of Meissner's corpuscles in the fingertips of primates. *Journal of Anatomy*, 227(1), 72-80. <https://doi.org/10.1111/joa.12327>
- West, M. J., Slomianka, L., & Gundersen, H. J. G. (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical*

*Record*, 231(4), 482-497. <https://doi.org/10.1002/ar.1092310411>

Wild, J. M. (1981). Identification and localization of the motor nuclei and sensory projections of the glossopharyngeal, vagus, and hypoglossal nerves of the cockatoo (*Cacatua roseicapilla*), cakatuidae. *Journal of Comparative Neurology*, 203(3), 351-377. <https://doi.org/10.1002/cne.902030304>

Wild, J. M. (1990). Peripheral and central terminations of hypoglossal afferents innervating lingual tactile mechanoreceptor complexes in *Fringillidae*. *Journal of Comparative Neurology*, 298(2), 157-171. <https://doi.org/10.1002/cne.902980203>

Wyndham, E. (1980). Diurnal Cycle, Behaviour and Social Organization of the Budgerigar *Melopsittacus Undulatus*. *Emu - Austral Ornithology*, 80(1), 25-33. <https://doi.org/10.1071/MU9800025>

*Zebra Finch Expression Brain Atlas*. (s. f.). Recuperado 20 de marzo de 2024, de <http://www.zebrafinchatlas.org/>

Ziolkowski, L. H., Gracheva, E. O., & Bagriantsev, S. N. (2022). Tactile sensation in birds: Physiological insights from avian mechanoreceptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 74, 102548. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102548>