



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL
MORFOLOGÍA VETERINARIA

CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL CÁLAMO DE LAS PLUMAS
REMERAS EN CRECIMIENTO EN PALOMAS

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MA. DEL ROSARIO MARTÍNEZ CALLES

TUTOR PRINCIPAL: DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DR. MARIO PÉREZ MARTÍNEZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MÉXICO, D.F. ENERO DEL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TUTOR

Dr. Carlos Gerardo García Tovar

Departamento de Ciencias Biológicas.
Unidad de Investigaciones Multidisciplinarias.
Laboratorio de Morfología Veterinaria y Biología Celular. L4
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Campo 4.
Cuautitlán, Estado de México.

COMITÉ TUTOR

Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda

Departamento de Morfología.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
México, Distrito Federal.

Dr. Mario Pérez Martínez

Departamento de Morfología.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
México, Distrito Federal.

REVISORES Y JURADO DE EXAMEN

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

Departamento de Biología Celular y Tisular.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Medicina.
México, Distrito Federal.

Dr. Gary García Espinosa

Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
México, Distrito Federal.

Dr. Carlos Gerardo García Tovar

Departamento de Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Campo 4.
Cuautitlán, Estado de México.

Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate

Departamento de Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Campo 4.
Cuautitlán, Estado de México.

Dr. Jorge Hernández Espinosa

Departamento de Morfología.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
México, Distrito Federal.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE APOYO A HISTOLOGÍA Y BIOLOGÍA CON EL FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO “DIGITALIZACIÓN DE LA COLECCIÓN DE PREPARADOS PERMANENTES QUE INTEGRAN EL ACERVO DEL LABORATORIO DE APOYO A HISTOLOGÍA Y BIOLOGÍA DE LA FES-CUAUTITLÁN PARA CREAR UN SITIO EN LÍNEA DE CONSULTA, ASESORÍA Y DIFUSIÓN CON ACCESO LIBRE” (CLAVE 1332). Y EN EL LABORATORIO 4 “MORFOLOGÍA VETERINARIA Y BIOLOGÍA CELULAR” DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MULTIDISCIPLINARIA DE LA FES-CUAUTITLÁN UNAM Y SE CONTÓ CON EL APOYO DEL PROYECTO “MORFOLOGÍA VETERINARIA Y BIOLOGÍA CELULAR” (CLAVE PIAPIC 15).

DEDICATORIAS

A Dios

Por ser mi único sustento y fortaleza.

En paz me acostaré, y así mismo dormiré; Porque sólo tú, Jehová; me haces vivir confiado.

Salmos 4:8

A mis Padres

Perfecta Calles y Pedro Martínez, por su amor, confianza, paciencia, cariño y apoyo, en cada una de mis metas, objetivos, inquietudes y proyectos.

A mis hermanos

Rodolfo, Agustín, Pedro y Lorena, por ser mis mejores amigos, por estar siempre conmigo sin condiciones y por todo su cariño. A Pati y Marce por darme siempre ánimos.

A mis niños lindos y queridos

Pedro, Kenia, Aarón, Iker y Mateo, por los momentos de alegría que me han dado.

A todos ustedes, por ser lo más importante de mi vida, los quiero mucho (Gracias).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ser una de sus semillas y por todo el apoyo brindado.

Un agradecimiento especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por darme la oportunidad de prepararme y por el apoyo brindado.

A la Facultad de Medicina Veterinaria, por abrirme sus puertas y apoyarme

Un agradecimiento muy grande, al Programa de Maestría en Ciencias de la Salud y Producción Animal, por permitirme formar parte de sus objetivos.

A mi tutor: Dr. Carlos Gerardo García Tovar, por su colaboración, apoyo, asesorías, para realizar éste proyecto y por la confianza que depositó en mí, a pesar de las circunstancias; por su contribución en mi desarrollo académico, por sus consejos, amistad, y enseñanzas (muchas gracias).

Al comité tutorial: Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda y al Dr. Mario Pérez Martínez, por sus observaciones, asesorías y recomendaciones oportunas para mejorar éste trabajo.

Al comité revisor. Dr. Andrés E. Castell Rodríguez, Dr. Gary García Espinosa, Dr Carlos I. Soto Zárate y al Dr Jorge Hernández Espinosa, por sus observaciones y recomendaciones.

Al M en F. Germán Isauro Garrido Fariña, por colaborar en la realización e interpretación de los preparados histológicos, en el laboratorio de apoyo a histología y biología; por compartir sus conocimientos, por sus asesorías técnicas, observaciones, recomendaciones y por su amistad.

Al MVZ José Luis Nieto Bordes y al MC Francisco Rodolfo González Díaz, por su apoyo y asesoría técnica, para la elaboración e interpretación de los preparados histológicos de inmunofluorescencia, realizados en el laboratorio de Morfología Veterinaria y Biología Celular, L4 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria.

Al Dr. Tonatiuh Sánchez Cruz, por su apoyo para la utilización del microscopio de fluorescencia ubicado en su laboratorio, para la interpretación de los preparados de inmunofluorescencia y la digitalización de los mismos, por su amistad y apoyo.

Al MVZ Adrián Orive Ortiz por contribuir con el material biológico, permitiendo usar sus palomas mensajeras, por su amistad, apoyo y amabilidad.

Al. Dr. Rubén Misael Oliver González, por su apoyo en este avance profesional, siempre aconsejándome con su experiencia, contribuyendo a mi desarrollo académico.

A la Dra. Susana E. Mendoza por su participación en mi formación académica, en éste periodo de estudios, por su apoyo, consejos, recomendaciones y amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Arturo Ángel Trejo González por su amistad, apoyo y consejos claves para ésta etapa de mi vida. Por estar siempre presente.

A la Dra. Clara Aguillón, Dr. Librado y a Meche, por su apoyo y ayuda.

Al MVZ ESP. Hugo César López Farías por el apoyo brindado.

A los profesores amigos y compañeros de trabajo:

Dra María. Leonor Quintero Mora, por formar parte de mis mentores, gracias por sus enseñanzas, asesorías, consejos, recomendaciones y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Nacho, por su amistad, apoyo, consejos y enseñanzas.

A la MVZ Reyna Pichardo Molinero, por su apoyo a lo largo de mis estudios, por sus enseñanzas, asesorías técnicas para mejorar en mi trabajo diario y así poder terminar este proyecto.

A Liliana junto con su Familia, La Familia Zúñiga Martínez, por estar siempre apoyándome, extendiendo una mano amiga. Por tu apoyo, consejos y cariño.

A Eli; Bricia, Lidia, Rosita y Gaby por ser parte de mis mejores amigos, por sus consejos y por darme siempre ánimos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: MVZ Tere (fue muy buena idea trabajar juntas, hubo buenos resultados). Toño, Rosario y Nayeli, por su amistad, siempre apoyándome y aconsejándome.

RESUMEN

Las plumas de algunas especies de aves se han estudiado en procesos de diferenciación celular embrionaria, interacciones intermembranarias; en la mayoría se describe la histología, y la presencia de células no diferenciadas de tipo troncales. Hay pocos estudios histológicos en animales adultos que describan de manera secuencial la maduración de los componentes celulares, por lo que el objetivo de este trabajo fue describir las características histológicas, abarcando principalmente los elementos celulares y sus relaciones anatómicas, durante el crecimiento de las plumas en etapa adulta. Se muestrearon 10 machos adultos de palomas mensajeras (*Columba livia*), se extrajeron las plumas remeras primarias de las alas para inducir la regeneración de las plumas. Posteriormente se tomaron muestras de los días 8, 13, 18, 23 y 28 de las plumas en regeneración, de la etapa de crecimiento. Una vez obtenidas las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% y Formol-amortiguado. Se disecaron las plumas para obtener solamente el cálamo; se procesaron por el método de parafina y congelación, fueron cortadas longitudinal y transversalmente en el extremo proximal del cálamo. Se tiñeron con técnicas generales, topográficas y específicas. Los resultados mostraron en el día 8 la presencia de la zona ramogénica muy marcada, tendiendo a disminuir al día 28. Desde el día 8 al 23, en las crestas de lengüeta se observaron las células de la barba, barbulares y las células de la placa axial; quedando delimitada cada cresta por la placa marginal. Se observó un aumento en los vasos sanguíneos de la pulpa y de las divisiones mitóticas en el epitelio a partir del día 13. Las características celulares variaron de acuerdo a la región de las crestas, mostrando algunas transiciones que no se habían sido reportado en estudios previos. La papila y la pulpa presentaron tejido conjuntivo con células fusiformes y redondas; la pulpa disminuyó gradualmente y la papila permaneció constante. Los resultados obtenidos permitieron concluir que en la etapa de crecimiento de la pluma los elementos histológicos permanecieron constantes, existiendo solo variaciones en las características morfológicas celulares de la placa marginal y la placa barbular de las crestas de las barbas, debido al proceso de diferenciación que presentó el epitelio en donde se dieron procesos de proliferación, muerte y maduración celular, en la etapa de crecimiento. Permitiendo la formación de los elementos estructurales anatómicos de la pluma.

Palabras clave: pluma, regeneración de la pluma, morfogénesis de la pluma, crecimiento de la pluma.

ABSTRACT

The feathers of some bird species have been studied in embryonic cell differentiation processes, intermembrane interactions, cell signaling, ectodermal organ regeneration and morphogenesis; most of the reports describes histology, with the presence of undifferentiated stem cells type. Originating and regenerated by the formation of an epidermal ridges in a filamentary structure within feather follicle. Few histological studies in adult animals sequentially describing the maturation of cellular components, so the aim of this survey was to describe the histological features, mainly covering the cellular elements and their anatomical relationships; during growth of the feathers in the adult stage. Ten adult male homing pigeons (*Columba livia*) were sampled, the *remiges primariae* to induce regeneration were removed. Subsequently samples regenerating feathers at the time of the outbreak and on different days of growth were taken; the first sample was taken on day 8, after removal of the feathers, then the other samples were taken every 5 days, this is on days 13, 18, 23 and 28 of the growth stage. After obtaining the samples were fixed in 4% Paraformaldehyde, Carnoy or buffered-Formalin. The *calamus pennae* only were dissected; proceeded to develop the histological preparations conducting longitudinal and transverse sections, the latter in the proximal end of the *calamus*. Stained with general, topographical and specific techniques. The results at day 8 showed the presence of marked ramogenic area, tending to decrease at day 28. From day 8 to 23 on the barbed ridge, barb, barbule and axial plate cells were observed; each ridge being bounded by the marginal plate. The increased blood vessels in the pulp and mitotic divisions in the epithelium, were observed from day 13. The cellular characteristics varied according to the region of the barbs ridges, showing some transitions that have not been reported in previous studies. The papilla and pulp presented connective tissue with spindle-shaped cells and round cells; gradually decreased pulp but the papilla remained constant. In conclusion in the growth feather, the histological elements remained constant, the variations were seen in the cellular morphological characteristics in the marginal plate and barbular plate of barbs ridges, derived of the differentiation cellular, proliferation processes, cell maturation and death in the epithelium occurred in the growth stage. Allowing the formation of the elements anatomical structures of the feather.

The ramogenic area, cell transition of marginal plate and differentiation of the ridges in the epithelium, originated feathers branches.

Keywords: feather, feather regeneration, morphogenesis of the feather, feather growth.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades de las palomas domésticas	2
1.2 Anatomía de la pluma.....	2
1.3 Histología de la piel	5
1.4 Histología de la pluma	5
1.5 Histofisiología.....	10
1.6 Origen embrionario de la pluma	11
1.7 Moléculas de señalización	12
1.8 Crecimiento y regeneración de la pluma	15
1.9 Muda de la pluma	18
1.10 Factores que afectan el crecimiento de la pluma	19
II. JUSTIFICACIÓN.....	20
III. HIPÓTESIS.....	21
IV. OBJETIVO GENERAL.....	22
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
6.1 Toma de muestra.....	24
6.2 Preparados histológicos	24
6.3 Tinciones.....	25
6.4 Técnicas de histoquímica.....	27
6.5 Fluorescencia	28
6.6 Observación al microscopio.....	28
VII. RESULTADOS	29
VIII. DISCUSIÓN	49
IX. CONCLUSIONES	58
X. PERSPECTIVAS	59
XI. REFERENCIAS.....	60

ÍNDICE DE CUADROS

	PAG
Cuadro 1. Diseño experimental.....	23

ÍNDICE DE TABLAS

	PAG
Tabla 1 Valoración de las estructuras generales características del cálamo de la pluma de paloma.....	46
Tabla 2 Valoración de los elementos histológicos del epitelio del cálamo de la pluma de paloma.....	46
Tabla 3 Valoración de los elementos celulares del epitelio.....	47
Tabla 4 Células de la pulpa y papila dérmica de la pluma de paloma.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG
Figura 1. Componentes Anatómicos de la pluma.....	4
Figura 2. Cálamo.....	8
Figura 3. Región medial del cálamo.....	9
Figura 4. Componentes histológicos del filamento de la pluma a nivel del cálamo (1).....	30
Figura 5. Componentes histológicos del filamento de la pluma a nivel del cálamo (2).....	31
Figura 6. Componentes histológicos del filamento de la pluma a nivel del cálamo (3).....	32
Figura 7. Aumento de cornificación en el epitelio.....	33
Figura 8. Neovascularización subepitelial.....	34
Figura 9. Cortes transversales del cálamo a nivel del epitelio.....	35
Figura 10. Características morfológicas de las crestas de las barbas.....	37
Figura 11. Cortes longitudinales del cálamo a diferentes niveles.....	38
Figura 12. Zona de transición, entre la región distal del cálamo y el raquis...	39
Figura 13. Elementos celulares de la Papila dérmica y de la Pulpa (1).....	42
Figura 14. Elementos celulares de la Papila dérmica y de la Pulpa (2).....	43
Figura 15. Elementos celulares de la Papila dérmica y de la Pulpa (3).....	44
Figura 16. Microscopia de fluorescencia con DAPI.....	45
Figura 17. Reacción positiva a lípidos en la pulpa y la papila.....	45

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad las palomas empiezan a utilizarse en el país, como una fuente de ingreso económico importante. Es posible considerarlas como una especie animal empleada para la obtención de alimento y en la investigación, en el área de biomedicina e ingeniería de tejidos. Estas últimas áreas están tomando gran importancia en la terapéutica, pues cada día se pretende encontrar nuevos tratamientos o terapias que ayuden a mejorar o solucionar los procesos patológicos, con base a la generación de conocimientos básicos de procesos biológicos de los organismos animales. La medicina regenerativa o terapia celular (área de la ingeniería de tejidos) se encarga de la aplicación de algunos de éstos conocimientos, que permiten identificar las células que participan en el desarrollo, proliferación y crecimiento de los tejidos, incluyendo estudios moleculares y topobiológicos. Dentro de los estudios topobiológicos se incluyen tamaño, expansión y forma celular; a su vez la arquitectura y disposición de los tejidos durante los procesos de organogénesis (Yap, 2012; Gade, Pratheesh, Nath, Dubey, Amarpal, & Sharma, 2012; Chang, y et al, 2004; Alibardi, 2010). La mayoría de los órganos se forman en la etapa de desarrollo, pero los nuevos órganos también se pueden formar en los estados fisiológicos o después de las lesiones en la edad adulta, un ejemplo de ello son las plumas. Debido a esto, las plumas son un buen modelo para investigar cómo los factores sistémicos remodelan la regeneración ectodérmica de órganos (Lin, Wideliz, Yue, Li, & Wu, 2013). Por lo tanto, para la realización de éstas investigaciones, es importante de inicio, analizar la anatomía macroscópica y microscópica de los tejidos; para contribuir a la identificación de las células que los conforman y las funciones que realizan. Por lo mismo, es importante la descripción histológica en plumas de palomas, ya que sin duda esta ciencia básica es importante para la integración de hallazgos anatómicos microscópicos normales, que permiten posteriormente identificar alteraciones y sus posibles soluciones. Por lo tanto se considera una herramienta importante en la práctica médica y en la investigación.

1.1 Generalidades de las palomas domésticas

Las palomas son del género y especie *Columba livia*. Se alimentan de granos y frutas. En el aspecto reproductivo, se consideran monógamas. El tamaño de la puesta es de 1 a 2 huevos, y ocasionalmente 3; las hembras invierten más tiempo en la incubación, ésta dura de 11 a 30 días. Los pichones son altriciales y empluman de los 10 a los 36 días. Cuando los juveniles crecen cambian su plumaje al plumaje de adultos y entran a la madurez sexual a los 6 o 12 meses. Pueden ser animales solitarios o muy sociales. Algunas especies son sedentarias y otras son migratorias, dependiendo de la disponibilidad de alimento (SEMARNAT, 2009).

En los últimos años se han utilizado como alimento, tanto los huevos como los animales adultos (Gallina & López, 2011). Por sus características, fisiológicas, sociales, de comportamiento, manejo y económicas, se consideran muy aptas para su utilización en la investigación, y una de las estructuras que por sus características anatómicas y fisiológicas pueden ser de gran utilidad, son las plumas.

1.2 Anatomía de la pluma

Anatómicamente una pluma consta principalmente de un eje y un vano o veleta. El eje está constituido en su longitud por dos porciones, el cálamo (estructura tubular, corta, no pigmentada e insertada en la piel), posee un orificio en la base llamado ombligo inferior y otro hacia la superficie de la piel, el ombligo superior, ambos orificios delimitan a la papila dérmica y pulpa; la papila es permanente y la pulpa se deseca conforme madura la pluma (Fig. 1A, 1C). Presenta en el extremo proximal un ahusamiento que impide que sea completamente tubular, en ésta región cambia de forma y tamaño, se cree que esto influye en el tamaño de la papila. Su forma puede variar de acuerdo a la especie y a la región del cuerpo (Pass, 1995; Prum & Dyck, 2003; Maderson, Hillenius, & Hiller, 2009). El raquis, es la continuación del cálamo en la porción externa de la piel, su diámetro disminuye hacia la punta de la pluma. A nivel del raquis se disponen lateralmente las barbas que le dan

forma a la pluma (constituyen la veleta o vano). Cada barba presenta en sus bordes una serie de pequeñas ramas o bárbulas, en donde se pueden observar los procesos bárbulares (ganchos) cuya función es la de engarzarse con los de las barbas vecinas para mantenerlas unidas entre sí; gracias a esto las plumas pueden presentar rearrreglos al momento que las barbas se separan unas de otras (Fig. 1B) (Prum & Dyck, 2003). Las bárbulas son de dos tipos: proximales y distales y pueden presentar o no procesos barbulares (Dyck, 1985; Torralva, Espinosa, & García, 1992). Por la presencia o ausencia de los procesos barbulares las plumas son de tipo pennacea, plumulacea o mixtas, cuando son mixtas la región pennacea se localiza en la parte distal de la pluma y la plumulacea proximalmente (Maderson, Hillenius, & Hiller, 2009).

Por las características anatómicas se clasifican de la siguiente manera: plumón, semipluma y pluma. Enfocándonos un poco más en esta última, se le conoce como pluma de contorno (ya que condiciona la forma típica del ave), cubren todo el cuerpo. Presenta una parte pennacea y otra plumulacea. Dentro de este tipo de plumas se encuentran las rectrices (timoneras) y remeras. Las plumas remeras son grandes, asimétricas y en la porción más baja son radialmente simétricas. Se localizan en el borde caudal del antebrazo (remeras secundarias) y de la mano (remeras primarias). Las rectrices o timoneras, son grandes, y están implantadas en la cola (Brogil, Gamero, Hohtola, Orell, & Nilson, 2011; Douailly, 2009; Jeffery, 1987; Torralva, Espinosa, & García, 1992; Widelitz et al, 2003).

De manera general las funciones de las plumas son: el vuelo, la termorregulación, protección física, sirven para la natación y una coloración brillante en la pluma es más atractiva para la búsqueda de pareja (Bragulla & Hirschberg, 2003); cada una de estas funciones dependerá de la localización de la pluma, arquitectura y estructura histológica de las mismas. Por lo tanto es importante conocer sus características histológicas.

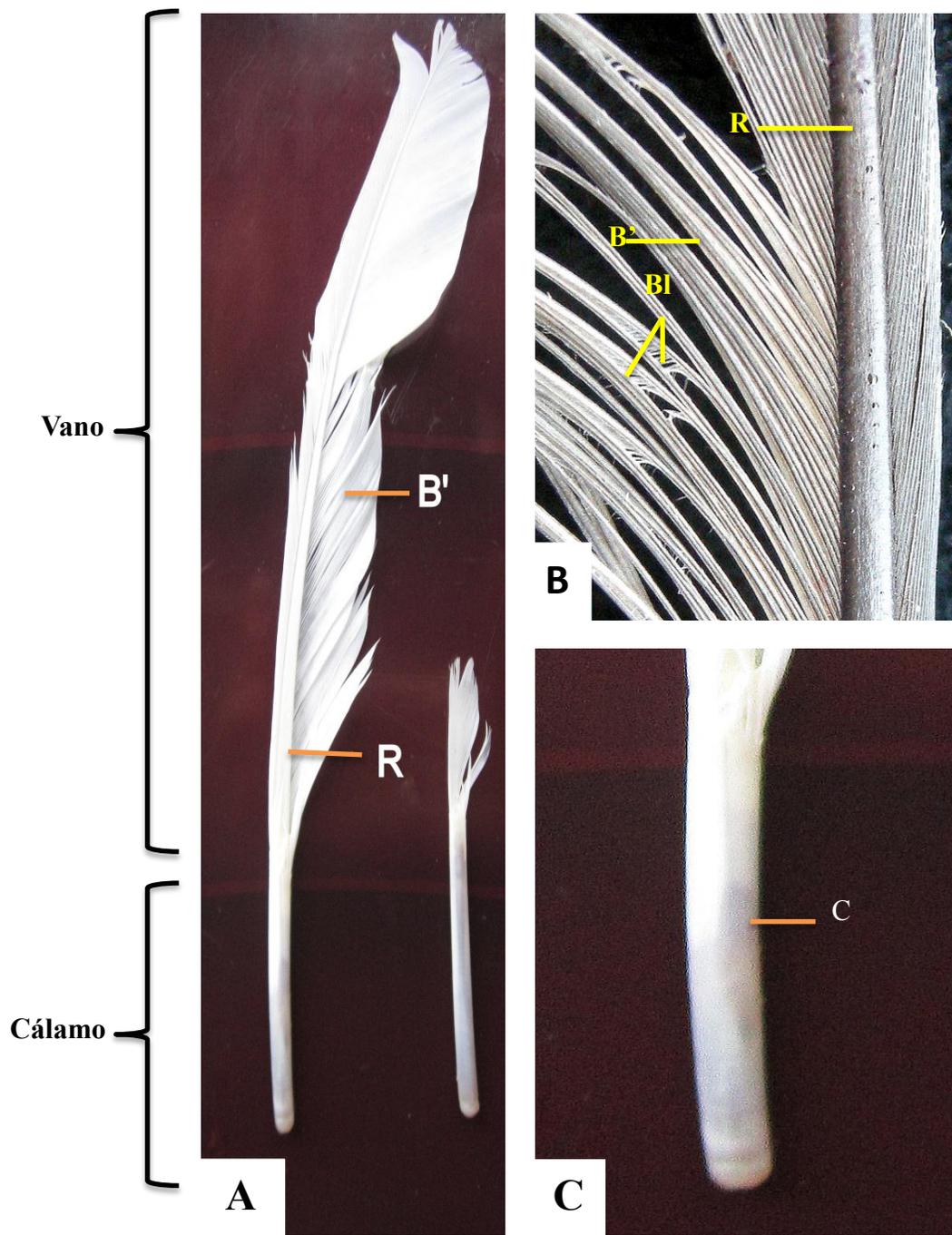


Figura 1. Componentes anatómicos de la pluma. Pluma remera (A). Vano (B). Cálamo (C). Barba (B'). Bárbula (BI). Cálamo (C). Raquis (R).

1.3 Histología de la piel

Las plumas son apéndices de la piel en las aves, por lo tanto es importante conocer como está estructurada ésta última.

La piel en las aves es muy delgada, histológicamente presenta una capa superficial denominada epidermis, que se caracteriza por ser fina y laxa, compuesta por un epitelio estratificado escamoso queratinizado, a diferencia de los mamíferos presenta 3 estratos definidos: basal, espinoso y córneo.

La segunda capa es profunda y se le conoce como dermis; constituida por tejido conectivo colágeno que sostiene a la epidermis y en donde encontramos folículos plumosos, vasos sanguíneos, tejido linfóide, pocas terminaciones nerviosas y músculo no estriado.

Presenta una tela subcutánea, que no se considera como parte de la piel, es importante para su sostén y funciona como amortiguador, ya que contiene el panículo adiposo (Banks, 1986). Las aves no presentan glándulas cutáneas, excepto por la presencia de la glándula uropígea, las glándulas auriculares y las glándulas de la ventosa (Dyck, 1985; Jeffery, 1987). Algunas características histológicas de la piel se conservan en la pluma ya que su origen en algunas especies de aves es a partir de la misma en etapa embrionaria. A continuación se describirá la histología de las mismas.

1.4 Histología de la pluma

Existen dos componentes histológicos básicos de la pluma: 1) Epidermis y 2) Mesénquima.

1) Epidermis

La epidermis está formada por un epitelio estratificado escamoso cornificado; presenta un estrato basal, intermedio y un estrato superficial, a partir de estos estratos se forman estructuras en forma de pliegues, denominadas crestas de lengüeta, que al madurar se queratinizan para convertirse en el cálamo, raquis y las ramas de las plumas, quienes contendrán a las barbas y bárbulas (Figs. 2A, 2C) (Pass, 1995; Shere & Chuong, 1996). Se integran a nivel celular de la siguiente manera:

Crestas de lengüeta o de la barba: son masas de células interconectadas, constan de 20 a 30 capas del estrato intermedio del epitelio, están dispuestas en forma de pliegues longitudinalmente en todo el eje del filamento de la pluma (Figs. 2A, 2C, 3B, 3C) (Prum & Dyck, 2003). Las células que las conforman son las siguientes:

a) Queratinocitos: son células que mantienen la queratinización, permanecen unidas mediante desmosomas hasta que la pluma emerge (Prum & Dyck, 2003; Bragulla & Hirschberg, 2003). Dentro de este tipo celular se encuentran las células de la placa marginal, barba, bárbula y las células de apoyo.

b) Células de la capa marginal: son células que forman el estrato basal durante la diferenciación de las crestas, producen queratina en muy poca cantidad, al final de la maduración de las crestas tienden a desaparecer (Fig. 2D).

c) Células de la barba: al momento que se forman las crestas, estas células tienen su origen del estrato intermedio, se localizan en la región del ápice de la cresta, en forma de un “cúmulo nodular” adyacente a la placa marginal (Fig. 2D).

d) Células de las bárbulas: se localizan en las caras laterales de las crestas; tienen su origen a partir del estrato intermedio del epitelio (Fig. 2D).

e) Células de soporte o apoyo: Se identifican por un reducido grado de β -queratinización y la acumulación de lípidos; al madurar no forman tejidos cohesivos, como consecuencia se separan hasta finalmente desaparecer (Maderson, Hillenius, & Hiller, 2009). Por lo tanto se localizan entre los queratinocitos. Algunas de ellas se disponen en la región media de la cresta (a nivel del eje de la cresta) (Fig. 2D).

f) Melanocitos: Son células con prolongaciones citoplasmáticas, producen la melanina en la pluma, se originan de la cresta neural y migran a la porción germinal en el desarrollo de la pluma a nivel de la pulpa. Transfieren sus melanosomas a la superficie de los queratinocitos (Prum & Dyck, 2003).

En la zona periférica externa de las crestas se va acumulando la queratina producida por los queratinocitos, y a partir de ésta capa de la epidermis se formará la vaina.

Vaina: localizada en la parte externa de la pluma; constituida de células planas, protege a la pluma durante el desarrollo y se pierde una vez que madura (Figs. 2B, 2D, 3A, 3B, 3C).

Collar: en el cuello del folículo, se ha encontrado la presencia de una protuberancia que forma un collar, aquí residen las células troncales de queratinocitos, en fase de crecimiento (Fig. 3D). Estas células troncales de queratinocitos de las plumas son de ciclo lento y dan lugar al tránsito de la progenie, que avanza verticalmente (hacia arriba) y diferencia las barbas. La división celular en el collar está limitada a tales células contribuyendo a la formación de la zona ramogénica, en donde se empezarán a formar las crestas de lengüeta, aquí se observan células de forma fusiforme, alargadas y muy finas, denominadas células oscuras (Lillie & Juhn, 1938; Lillie & Wang, 1941)

2) Mesénquima

La parte central del filamento (pluma) contiene células mesénquimales, fibroblastos y vasos sanguíneos, dando lugar a la papila y a la pulpa.

Papila y Pulpa: la papila dérmica se localiza en la base del folículo y arriba de ella se encuentra la pulpa (Figs. 2B, 3A) (Prum & Dyck, 2003; Bavdek, Golob Z, Van Dijk, Dorrestei, & Fazarinc, 1997).

Vascularización de la pluma: la epidermis es completamente dependiente de los vasos sanguíneos de la dermis, ya que ésta última participa con el gradiente de difusión en la diferenciación de las células epidérmicas adyacentes, difundiendo los nutrientes y moléculas de señalización como factores de crecimiento. También funciona como soporte mecánico para la diferenciación de queratinocitos (Bragulla & Hirschberg, 2003; Maderson, Hillenius, & Hiller, 2009).

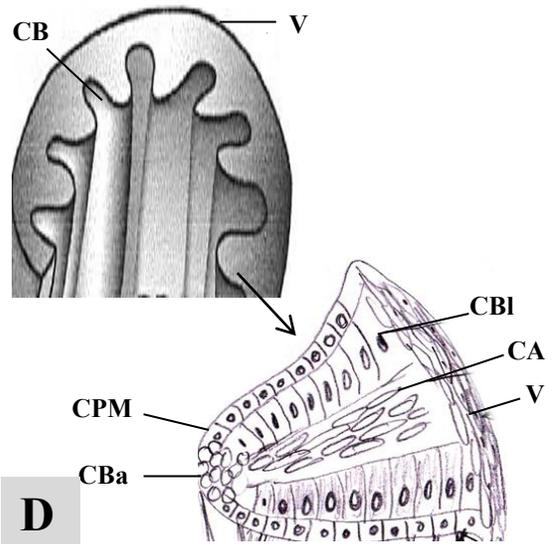
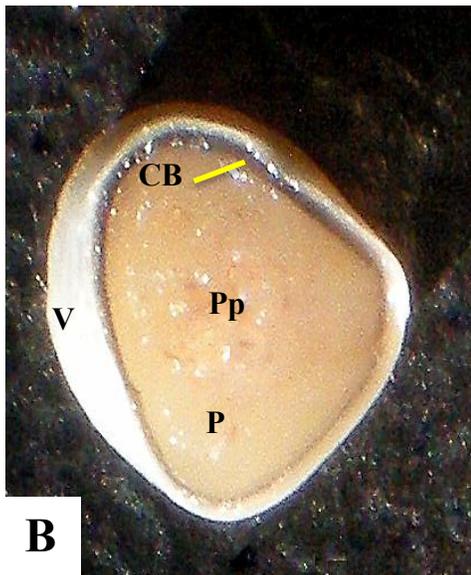
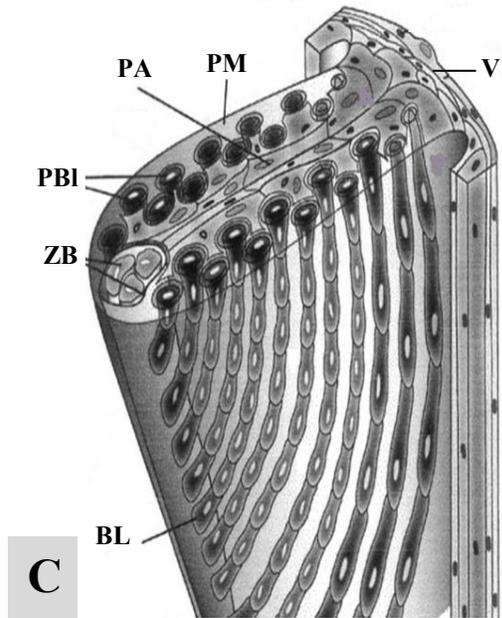
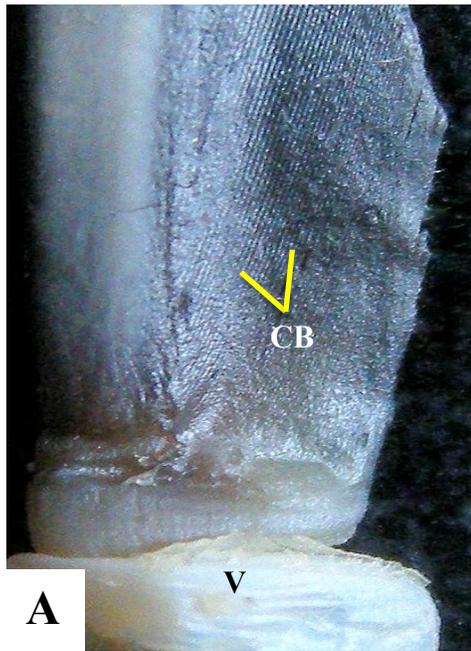


Figura 2. Cálamo. Corte longitudinal: pared del cálamo (vaina retraída hacia abajo) (A). Corte transversal (B). Cresta de la barba; adaptado de Alibardi, 2006 (C). Células de la cresta de la barba; adaptado de Alibardi, 2006 (D). Bárbula (BL). Células de Apoyo (CA). Cresta de la Barba (CB) Células de la Barba (CBa). Células de la bárbula (CBI). Células de la placa marginal (CPM). Papila (Pp). Pulpa (P). Placa Axial (PA). Placa Barbular (PBI). Vaina (V). Zona de la Barba (ZB).

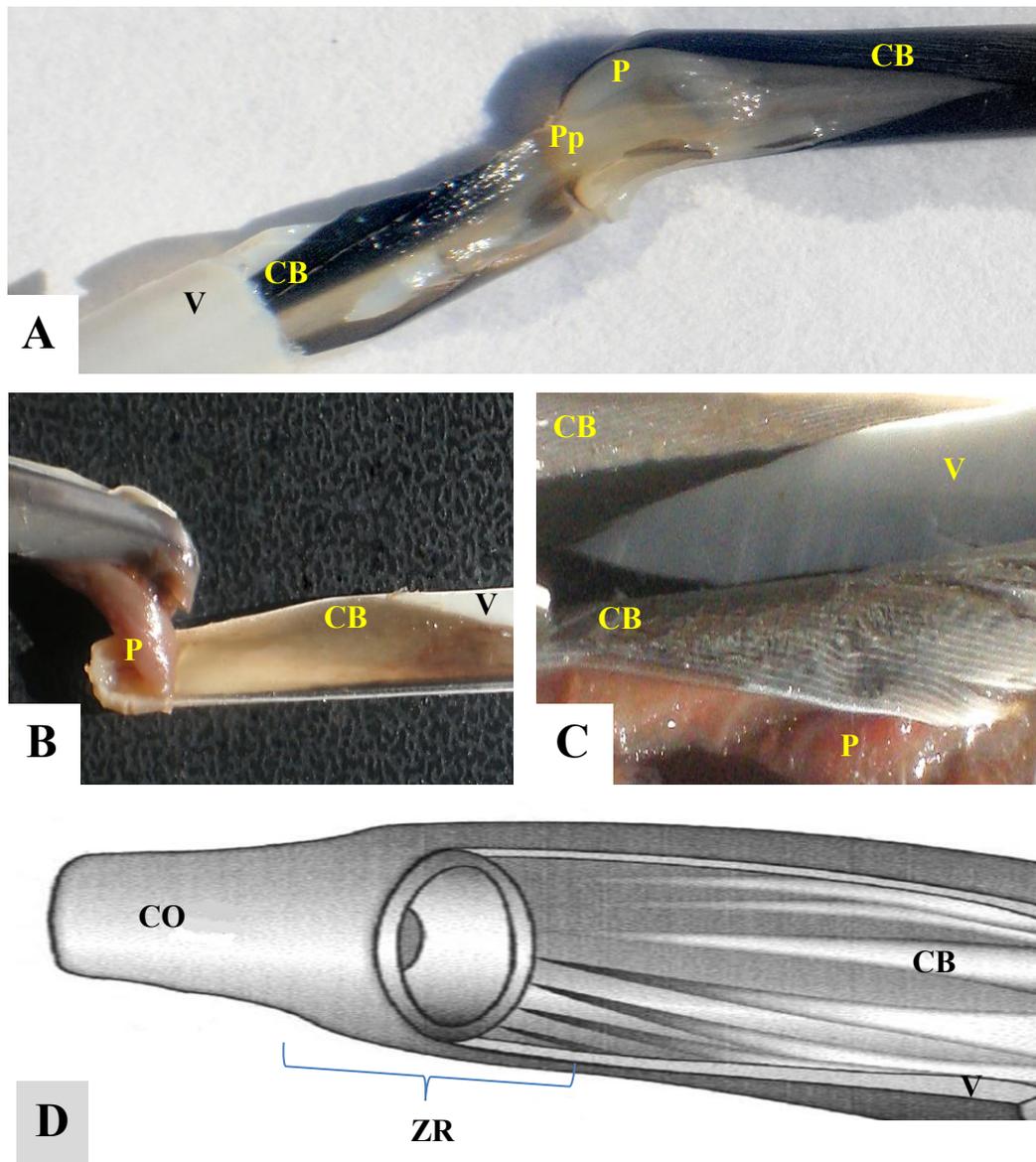


Figura 3. Región medial del cálamo. Corte longitudinal. Tejido Epitelilal y Mesénquima (A). Separación del epitelio y Mesénquima (B). Crestas de la Barba (C). Esquema del cálamo adaptado de Alibardi, 2006 (D). Crestas de la Barba (CB). Collar (CO). Pulpa (P). Papila (Pp). Vaina (V). Zona Ramogénica (ZR).

Cada uno de estos componentes realiza funciones muy definidas que contribuyen en las características anatomofuncionales de la pluma. A continuación se considera la histofisiología de los mismos.

1.5 Histofisiología

La diversidad estructural y funcional de las plumas es una consecuencia de la variación microestructural en la forma del raquis y barbillas (Prum & Williamson, 2001).

Dentro de las funciones realizadas por las células de la barba, barbulares y la capa marginal, se encuentra la producción de la queratina y de lípidos estructurales. La formación de los lípidos se considera una analogía con la producción de las proteínas estructurales en el proceso de queratinización (seboqueratinocitos) (Bragulla & Hirschberg, 2003). Los tipos de queratina que se sintetizan son la alfa (ácida) y beta (básica). Dentro del cálamo los queratinocitos que rodean a la pulpa producen α -queratina y también pueden producir lípidos; en el cálamo de plumones se produce β -queratina (Prum & Dyck, 2003; Douailly, 2009). En el vano o veleta (conocido como espata) a nivel del raquis (en forma de cono largo) y las tapas de la pulpa, se produce β -queratina. El epitelio folicular contiene α -queratina (Alibardi, 2010; Maderson, Hillenius, & Hiller, 2009). En todos los amniotas, las últimas capas suprabasales de la epidermis se cornifican, quedando células muertas, llenas completamente de α -queratina con proteínas amorfas y lípidos, que formarán una barrera para evitar la pérdida de agua (Douailly, 2009).

Las células de apoyo forjan el patrón ramificado de las barbas, algunas actúan como espaciadores de las crestas de lengüeta, dan soporte mecánico a las crestas antes de que se queratinicen totalmente, y en menor grado participan en la cornificación (Alibardi, 2007c).

Las células generadas desde el collar, sintetizan inicialmente haces de α -queratina (ácida y suave), posteriormente en etapas sucesivas de diferenciación ésta es reemplazada por β -queratina (básica y dura) (Alibardi, 2007c; Bragulla & Homberger, 2009).

Recientemente se ha sugerido que la queratina en mamíferos está involucrada en el transporte de vesículas intracelulares como por ejemplo los melanosomas, a partir de su sitio de endocitosis de la periferia de la célula a la zona central, se ha observado que participa en la señalización celular, por ejemplo: señales pro-apoptóticas y distribución de proteínas de membrana de células epiteliales polarizadas, compartimentalización celular,

diferenciación celular, influencia en el metabolismo por la regulación de síntesis de proteínas y crecimiento celular (Alibardi, 2010).

En el proceso de queratinización en los mamíferos, los queratinocitos aparte de producir la queratina producen proteínas de un complejo filamento queratina-matriz, tales como profilagrina y de la envoltura cornificada, tales como involucrina. Además de éstas proteínas que se sintetizan, producen lípidos especiales, como glucosilceramida que son almacenados en vesículas cubiertas con membrana, que son liberadas posteriormente al espacio intercelular a través de exocitosis (Bragulla & Homberger, 2009).

La dermis madura participa fundamentalmente en el mantenimiento epidérmico, la proliferación y diferenciación de la pluma, siendo importante para el proceso de regeneración durante la muda de plumas (Bavdek, Golob Z, Van Dijk, Dorrestei, & Fazarinc, 1997).

Todos estos elementos histológicos se forman en la etapa embrionaria conservando algunas de sus características anatomofuncionales. A continuación se describe de manera general este proceso de morfogénesis.

1.6 Origen embrionario de la pluma

La piel tiene su origen a partir del mesodermo (dermis) y ectodermo (epidermis). En este órgano se realizará la morfogénesis de la pluma. En el día 5 de incubación, el primer paso fundamental es la formación de una dermis superficial densa y una dermis profunda escasa, por debajo de la epidermis. Posteriormente cuando la dermis madura por el día 7.5 de incubación, inicia la señalización para que la epidermis sufra un engrosamiento, originando una placoda suprayacente que formará los brotes, sitios conocidos también como primordios, que serán los brotes de las plumas en forma de yemas; quedando un espacio entre cada uno, denominado interbrote, resultado de las señales inductivas de la dermis hacia la epidermis; formándose a nivel de la piel, zonas con plumas denominadas pterilios y zonas sin plumas o apterios. Estos brotes en forma de yemas, presentarán un alargamiento en todo su eje, desde su base hacia su ápice, presentando un crecimiento hacia la superficie

externa, para formar un filamento. Dentro del filamento, las células epidérmicas empezarán a proliferar y a diferenciarse, provocando un espesor del epitelio por la aparición de múltiples capas celulares; observándose a este nivel unas placas, denominadas ramogénicas o zonas ramogénicas, en donde se empezarán a diferenciar las células epidérmicas en las crestas de lengüeta para formar barbas, bárbulas y procesos barbulares (Bragulla & Hirschberg, 2003; Song & Sawyer, 1996; Douailly, 2009; Lin, Luo, & Redies, 2004; Sawyer, Rogers, Washington, C. Glenn, & Knapp, 2005; Widelitz, *et al*, 2003; Michon, Charveron, & Dhouailly, 2007; Sawyer, Rogers, Washington, Glenn, & Knapp, 2005). En el día 14, la base de las yemas que presentaron un crecimiento hacia la superficie externa, realizan una invaginación para originar el folículo plumoso, albergando células troncales epidérmicas.

La epidermis de donde se originarán los componentes de la pluma, estará constituida por cuatro capas embrionarias, las cuales son: peridermis interna y externa, subperidermis y la capa basal. La peridermis dará origen a la vaina de la pluma, la subperidermis a las crestas de la barba (lengüeta) y las células basales cilíndricas formarán a la capa marginal (Alibardi, 2010). La arquitectura tridimensional de las ramas de la pluma dependerá del diámetro de la papila de la pluma, número, longitud y anchura de las crestas (Bragulla & Hirschberg, 2003). Las primeras plumas que se forman en los embriones son los plumones, posteriormente son sustituidas por las plumas juveniles y éstas al final, serán reemplazadas por las plumas adultas. La morfogénesis de la pluma está regulada por varias moléculas de señalización, a continuación se dan algunos ejemplos.

1.7 Moléculas de señalización

Los mecanismos moleculares que participan en la señalización para la inducción y especificidad de la pluma, aún no se conocen completamente, por lo cual se mencionan algunos ejemplos de moléculas que interviene en dichos procesos (Widelitz, *y et al*, 2003). En estudios realizados, se ha observado que la forma de las plumas, es el resultado de procesos morfogenéticos multinivel, los cuales se realiza por un proceso de inducción.

Una de las razones que pueden originar la diversidad de las plumas, es por su origen mesenquimal y por la competencia que presentan las células mesenquimales con el epitelio al que se relacionan. La señalización va del mesénquima al epitelio; formándose la placoda, para originar a los primordios, los cuales son regulados por señales inhibitorias y activadoras (estimulantes).

La supervivencia y la migración de los precursores dérmicos requieren señales derivadas del tubo neural; para la inducción de la placoda y del brote. Por ejemplo el Wnt 1 (factor que participa en la transdiferenciación de células epidérmicas en seboqueratinocitos puede tener la función similar a la del tubo neural, induciendo a la formación del tracto de las plumas con tamaño normal y distribución uniforme en la piel (Lin, Widelitz, & Chuong, 2006). Una de sus funciones es bloquear la degradación de la β catenina que se expresa en el epitelio de las plumas, realizando una función similar a la que realiza en la formación de la piel de los mamíferos (Douailly, 2009; Widelitz *et al*, 2003)

Cuando se expresa el Wnt 11 se inhibe la expresión de colágena II y NCAM (molécula de adhesión neural), e induce la migración celular (Lin, Jiang, Widelitz, & Chuong, 2006). En estudios realizados en pollos, se ha observado que la expresión ectópica de la β catenina, induce la formación de plumas en las regiones aptéricas de la piel (Widelitz, y *et al*, 2003).

Cuando se establece el tracto de la pluma, los primordios de la pluma en el individuo establecen patrones. Dentro de estos patrones las moléculas pueden actuar de manera restrictiva, iniciando con un nivel moderado en todo el tracto, intensificándose con el tiempo, dentro de los primordios de las plumas y disminuyendo por lo tanto fuera de éstos, ejemplo de ello es el Wnt-7a y β catenina. Otro ejemplo son los miembros Eda (ectodisplasina), en la región del brote; Eda es expresada en la dermis inter-brote, pero Edar (receptor de Eda) y Edaradd (dominio de muerte asociado a Edar) son expresados en la epidermis del brote. Eda puede ser inducido por β catenina y Edar puede ser suprimido por BMP. En el pelo Eda tiene una función inductora y al igual que en la pluma está implicada en la formación de la placoda (Lin, Jiang, Widelitz, & Chuong, 2006; Widelitz *et al*, 2003). Otras moléculas participan con el modo novo, es decir, que su expresión se dará más tarde

ya que salen de los primordios hacia la región inter-primordios. Dentro de estas moléculas se encuentra Sonic hedgehog (Shh), Delta-1, Noggin-1 y Ectodermic A4 (Widelitz *et al* 2003)

Las moléculas que actúan después del modo restrictivo, se involucran en la formación de los primordios, ya sea activando o inhibiendo. Algunas moléculas que funcionan como activadores, para aumentar el tamaño de los primordios o el número de primordios de las plumas, son: el Shh, FGF4, Noggin, Folistatina, entre otros. Dentro de los inhibidores están por ejemplo: BMP2, BMP4, activadores de la proteína quinasa C. El BMP (proteína morfogenética de hueso) no siempre actúa como inhibidor ya que el BMP7 por medio de señales de la activina estimula la formación de las porciones germinales de la pluma (Chuong, Yeh, & Jiang, 2013). Se ha observado que cuando se aumenta el número de receptores BMP, éstos se hacen más pequeños y cuando es inhibido por un aumento de Noggin, se hacen más grandes. Tanto los activadores como los inhibidores se expresan dentro de los primordios de la pluma (Widelitz, y *et al*, 2003).

Una vez que se forman los primordios, se genera la proliferación de células para su posterior modelado y morfogénesis, para originar a la pluma, dándose un desarrollo sobre su eje de manera antero-posterior. El alargamiento continuo de las yemas o brotes de las plumas, depende de la proliferación celular en el centro de los brotes, permaneciendo en él una región enriquecida por algunas moléculas como: Shh, NCAM, en el extremo distal del brote (Bragulla & Hirschberg, 2003; Widelitz *et al*, 2003).

En la regeneración de la pluma, BMP4 se expresa en la papila dérmica y en la pulpa proximal. Sus niveles de expresión son reducidos hacia la pulpa distal. Noggin un antagonista de BMP, se expresa en la pulpa en la zona donde empieza la ramificación. El Shh se expresa en la capa marginal del epitelio, con capacidad de inhibir la apoptosis en la misma placa marginal; pero al momento que inicia la diferenciación la placa barbular, el Shh empieza a disminuir su concentración en la placa marginal, originándose apoptosis en las células de ésta misma placa (Chuong, Yeh, & Jiang, 2013; Widelitz y *et al*, 2003).

Los genes importantes en la formación de la pluma, son los genes Homeobox (Hox y Msx). Como ejemplo de los genes Hox, podemos mencionar a Hox 6, importante en el mesénquima de la pluma ya que participa en la determinación del fenotipo de la misma.

Los genes *Msx-1* y *Msx-2*, su expresión en el brote largo a nivel del epitelio distal, hace que se pierda la asimetría de la pluma (Wideliz *et al*, 1997).

Gracias a estas interacciones podemos observar que la formación de la pluma está regulada por la formación de patrones en donde habrá variaciones de señalización, de acuerdo a la diferenciación de la misma. La ventaja que se tiene por la formación de estos patrones permite que las pluma presenten una renovación repetitiva, originando la formación de nuevos fenotipos que satisfagan las necesidades de los cambios del medio externo y o de sus diferentes etapas fisiológicas. Así mismo, los activadores o inhibidores pueden alterar las extensiones de la pluma y o modular el tamaño y número de las porciones germinales de las plumas; siendo dependientes su formación del momento (tiempo) y lugar dentro de la piel. Estos conocimientos sirven de base para aplicarlos en la medicina regenerativa; para obtener nuevas estructuras germinales de la piel, las cuales se reconstituyen de células son disociadas, estos estudios se han realizado de tejidos germinales de las plumas. Recientemente se han utilizado procesos similares para la construcción de pelo; basándose en la mezcla de células mesénquimales y epiteliales, siguiendo una interacción en una matriz plana en 3D en el dorso de un ratón; permitiendo la reconstitución de la piel y a su vez la formación de pelo (Lin, Wideliz, Yue, Li, & Wu, 2013). De esta manera se puede observar que las sirven como modelo de estudio en la regeneración de tejidos ectodérmicos.

1.8 Crecimiento y regeneración de la pluma

El crecimiento de las plumas se realiza en ciclos o fases denominadas anágena y telógena. La fase anágena representa el crecimiento desde el folículo a partir de la papila dérmica, y a nivel del cuello por el collar (protuberancia) de células troncales. Se forma la zona ramogénica y posteriormente da origen a las crestas epidérmicas (de lengüeta o de la barba). Cuando las plumas entran en la fase de reposo, la protuberancia del folículo desaparece debido a la contracción del cuello. En este momento, las células troncales de queratinocitos de la pluma descienden al ectodermo papilar y se quedan en reposo. Las células se activarán hasta la siguiente fase de crecimiento (Lin, Wideliz, Yue, Li, & Wu,

2013). En la fase telógena o de reposo, la pluma se encuentra anclada al folículo plumoso por medio de los músculos de la pluma, por puentes de queratina de la epidermis folicular y de la pluma, por contacto de las superficies; convexa de la pluma y cóncava del folículo plumoso, esto permite una conexión entre la porción epidérmica del folículo y la epidermis de la pluma. En la transición de la fase de descanso a la fase de crecimiento hay fases de muda e iniciación (Alibardi, 2007b; Lin, Wideliz, Yue, Li, & Wu, 2013). En la fase de iniciación se da la regeneración de la pluma.

La regeneración de las plumas se da por un modelo de morfogénesis heredado en la etapa embrionaria. En las aves adultas la regeneración de las crestas de la rama es necesaria para la formación de nuevas plumas y se da a nivel del cálamo y espata (Alibardi, 2007b).

La proliferación celular en la regeneración y el crecimiento inicia en la zona proximal de la pluma (región incluida dentro del folículo), quedando el tejido más diferenciado en la región distal.

La regeneración de la pluma, abarca el desarrollo lateral del epitelio, comienza del estrato basal hacia la superficie externa, hasta formar una capa queratinizada, originando a la vaina (Pass, 1995; Shere & Chuong, 1996).

La epidermis de la pluma al diferenciarse en las crestas de lengüeta, forma tres zonas importantes en cada cresta, las cuales se transformarán en los elementos de las ramas de la pluma, estas regiones son: la capa basal, zona central o medular y la zona cortical. A partir de la capa basal de las crestas se originará la capa marginal. Del estrato intermedio se formarán las regiones medular (células de la barba) y cortical (células bárbulares) de la cresta. Durante la diferenciación se produce por lo tanto la queratina y también aparentemente incluye un proceso de lipidización, produciendo más lípidos que queratinas. En las células de la región medular un signo de diferenciación es la producción de glucógeno (Prum & Dyck, 2003; Bragulla & Hirschberg, 2003). De la capa externa (estrato superficial) se formará la vaina de la pluma. El raquis se originará de un pliegue especial a nivel del epitelio.

Al darse la proliferación celular del filamento dentro del folículo, se genera una fuerza mecánica por las divisiones mitóticas continuas en el estrato basal del epitelio, se forma una

turgencia cutánea por la epitelización de los queratinocitos y una presión por la vaina al encerrar al epitelio; estos eventos influyen en el crecimiento de la pluma (Maderson, Hillenius, & Hiller, 2009).

Se observan cuatro fuerzas mecánicas durante la regeneración. La primera se da hacia la región distal; inicia desde la base del folículo, en donde se observan grupos densos de queratinocitos, encontrándose gran actividad mitótica en la capa germinal y entre los fibroblastos de la papila dérmica. Esta mitosis se basa en un movimiento celular hacia la región distal de la pluma hasta alcanzar la longitud deseada.

La segunda se dirige de manera radial, en la dermis se da una diferenciación de vasos sanguíneos, una matriz con la presencia de fibroblastos, aquí el núcleo dérmico presenta una turgencia, ejerciendo una presión radial en el filamento, incidiendo en las células circundantes; durante el crecimiento de la pluma y durante la involución de la pluma.

La tercera se produce de manera contraria a la segunda y es provocada por la vaina que se localiza en la parte externa de la pluma, dada por la epitelización temprana del tejido que se localiza dentro de la vaina; continúa hasta que la vaina madura y se rompe.

Por último, implica una fuerza de tracción distal de los “queratinocitos que están maduros”, sobre los queratinocitos menos maduros. Estas presiones hacen efecto por las uniones intercelulares (desmosomas) que existen entre los queratinocitos. Dentro de los primeros cambios se da una remodelación de la membrana basal, la cual presenta un plegamiento para delimitar a cada cresta de lengüeta y separar una de otra, en las células corticales se da una epitelización, en donde las células empiezan a acumular intracelularmente proteínas específicas y elementos del citoesqueleto; las células medulares empiezan a sufrir una hinchazón en la histodiferenciación. En la epitelización, también se dan modificaciones en las uniones de la superficie celular del epitelio estratificado escamoso en histodiferenciación. Las uniones estables formarán la capa cortical continua de todas las estructuras de la pluma. Las uniones que no son estables permiten la separación del raquis, barbas y bárbulas; la translucidez que pueda darse en algunas estructuras de la pluma es por la presencia de espacios u orificios que se formaron por la ruptura de estas uniones no estables. El aspecto fundamental en la morfogénesis de la pluma es la pérdida de

adhesividad intercelular para los queratinocitos, para lograr obtener el cambio de forma epitelial aplanada (Maderson, Hillenius, & Hiller, 2009). El crecimiento y regeneración de la pluma se repite cada vez que las aves realizan el recambio de las plumas por un proceso denominado muda.

1.9 Muda de la pluma

El plumaje se puede renovar mediante un proceso conocido como “muda”. Consiste en la caída de la pluma y su sustitución por otra nueva; se realiza de una a tres veces al año, al final del verano, después de haber criado en otoño, en la etapa post-reproductora, aunque en psitácidas (loros, guacamayos, cotorras, cacatúas, papagallos, periquitos y pericos) es normal que la muda suceda durante todo el año. Ésta no se realiza cuando las aves están migrando. Algunas especies pierden la mayoría de las plumas al mismo tiempo, mientras que otras lo hacen de forma más sistemática. Las plumas de vuelo, remeras y timoneras, se sustituyen en pares exactos, uno a cada lado del cuerpo, para mantener el equilibrio. La muda mantiene la funcionalidad, integridad y continuidad del plumaje, durante el reemplazo total o parcial del plumaje. Este proceso está regulado por hormonas, algunas de las que se han estudiado son: la hormona tiroidea, esteroides gonadales y prolactina. La prolactina en aves silvestres de vida libre y en cautiverio en condiciones normales aumenta sus niveles al inicio de la muda; en la especie altricial la prolactina es alta en la etapa de incubación, permaneciendo así durante el cuidado parental, sin embargo la crianza puede retrasar el inicio de la muda. En este caso los altos niveles de prolactina inhiben el inicio de la muda (Dawson, Perrins, Sharp, Wheeler, & Groves, 2009). Se pueden formar distintos tipos de plumaje en diferentes épocas del año ya que pueden funcionar en la elección de pareja y comunicación intrasexual reproductiva (Prum & Dyck, 2003).

1.10 Factores que afectan el crecimiento de la pluma

Las aves que presentan un buen estado nutricional asignan más recursos a la formación de las plumas y como consecuencia éstas plumas tienen una tasa de crecimiento más rápida y más amplia y en los animales que han sufrido estrés fisiológico disminuye el crecimiento de la pluma (Gienapp & Merilä, 2010).

La tasa de crecimiento de la pluma (medida del ancho de la barra de crecimiento) es dependiente al estado nutricional durante la muda y a su vez el estado nutricional puede variar por diferentes factores, por ejemplo: el estatus de dominancia, salud, alimentación, eficiencia de conversión alimenticia, sexo y edad. En estudios realizados por Gienapp (2010) se observó que en animales jóvenes no hubo diferencia en el crecimiento de la pluma entre hembras y machos, pero en animales adultos si se mostró una diferencia significativa en la tasa de crecimiento, presentándose más amplias las barras de crecimiento en los machos; considerándose que los machos son dominantes sobre las hembras, teniendo éstos más acceso al alimento. Otro factor que puede influir en las hembras, es la crianza de la progenie, ya que la muda se presenta después de ésta, por lo tanto sufren más estrés que los machos por lo cual asignan menos energía para el crecimiento de la pluma. Se comprobó que las hembras que crían más progenie, experimentaron menores tasas de crecimiento que las que criaron menos progenie, indicando un equilibrio en el esfuerzo reproductivo y mantenimiento somático. Considerando esto, los individuos que tenían mejor tasa de crecimiento en la pluma, tuvieron condiciones óptimas de sobrevivencia, surgiendo una hipótesis que la tasa de crecimiento de las plumas refleja la condición individual de las aves. Parte de esta condición es reflejada por la calidad del territorio de los individuos. Las aves de condición rasgo-dependientes, como masa corporal residual y tasa de crecimiento de las plumas, han sido utilizadas tradicionalmente como indicadores de condiciones determinadas de medio ambiente.

II. JUSTIFICACIÓN

Los estudios histológicos realizados de plumas de embriones y animales juveniles, han evaluado los siguientes elementos: células de la pulpa, la vascularización, desarrollo del epitelio (formación de la zona ramogénica, crestas de lengüeta y sus células). Son pocos los que se han hecho en animales adultos, las especies que se han estudiado son el zebra finch (*Taeniopygia guttata*), el pollo (*Gallus gallus*) y la codorniz (*Coturnix coturnix*). Estos estudios no abarcan los días de crecimiento en los animales adultos, dentro del mismo período no se lleva una secuencia e integración de las características morfológicas de sus componentes celulares y de las interacciones entre los mismos. Además son pocos los estudios que relacionan la interacción de los componentes de la papila y pulpa con el epitelio.

Por otro lado no se ha estudiado el grado de participación de las células del epitelio en el crecimiento de la pluma durante el desarrollo. Se ha podido observar que la estratificación del epitelio a nivel de la pulpa varía ligeramente en diferentes periodos y también en diferentes especies (Alibardi, 2009).

A nivel de la pulpa, para su diferenciación e identificación celular, sólo se puede hacer mediante técnicas histológicas ya que no existen aún marcadores para su utilización (Lin, Wideliz, Yue, Li, & Wu, 2013). Este estudio pretende caracterizar la histología del cálamo de las plumas remeras en crecimiento en palomas adultas; estudiando las características morfológicas celulares y relaciones anatómicas, para contribuir con ello con conocimientos que sirvan de base para futuros estudios sobre las poblaciones celulares, sus interacciones a través de las uniones y comunicación intercelular, así como en los que se realiza la identificación de marcadores de diferenciación celular, regeneración, desarrollo y crecimiento de tejidos.

El realizarlo en palomas es para introducirlas como una especie más en el área de investigación y a su vez para generar una fuente de ingresos económicos a los productores de éstos animales, tratando de borrar el concepto de fauna nociva que se les ha dado.

III. HIPÓTESIS

La estructura histológica del cálamo de las plumas remeras en palomas adultas presenta variaciones morfológicas durante la etapa de crecimiento.

IV. OBJETIVO GENERAL

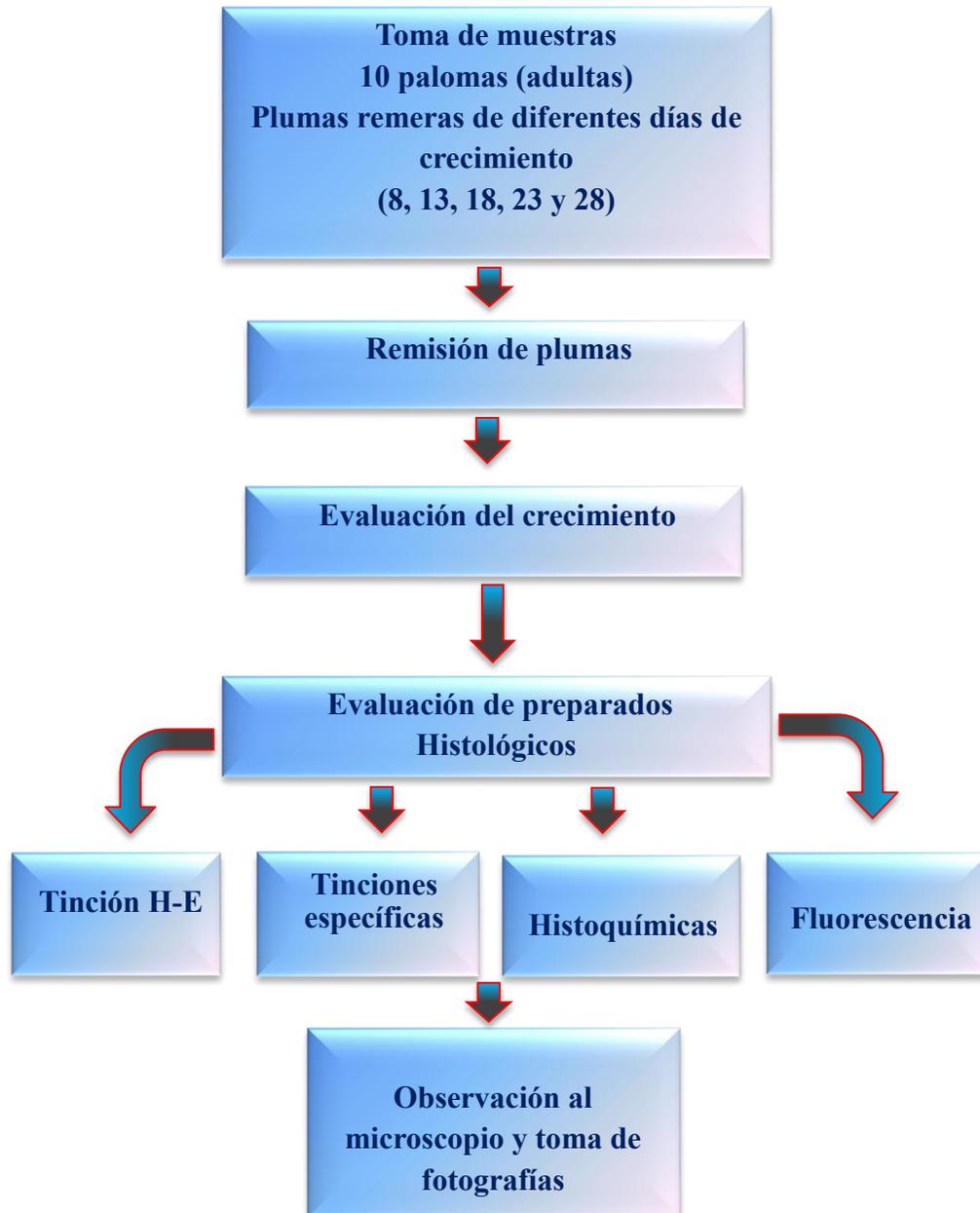
Caracterizar a nivel histológico el cálamo de plumas remeras en palomas adultas en diferentes etapas de crecimiento, mediante técnicas de tinción, para describir los cambios estructurales que suceden en dichas etapas

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Elaborar preparados permanentes del cálamo de plumas remeras, por medio de la técnica de inclusión en parafina para su posterior interpretación en el microscopio.
- Describir la estructura histológica del cálamo con tinciones generales, basándose en características morfológicas celulares y tisulares.
- Realizar tinciones topográficas y específicas para diferenciar las células del cálamo en las etapas de desarrollo.
- Identificar células en mitosis mediante el marcaje de DNA con DAPI y su posterior observación por medio de fluorescencia, para determinar la presencia de divisiones celulares.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

En el cuadro uno se muestra el método a realizar para la evaluación de las muestras del cálamo de plumas remeras en diferentes días de crecimiento en palomas.



Cuadro 1. Diseño experimental. Método para evaluar las plumas remeras en crecimiento.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Apoyo a Histología Veterinaria y en el Laboratorio 4 “Morfología Veterinaria y Biología Celular” de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, s/n. El tipo de estudio realizado fue descriptivo histológico.

6.1 Toma de muestra

Las palomas *Columba livia* que se utilizaron pertenecen a un criadero particular, las muestras se tomaron de manera aleatoria, la técnica de recolección se realizó por el dueño de los animales, consta de la extensión del ala y la extracción de la pluma; se tomaron no más de tres plumas por ala en cada etapa de crecimiento, se muestrearon 10 machos adultos, de entre 5 y 9 años de edad. De esta forma se indujo la regeneración de las plumas previamente maduras, las muestras se tomaron en intervalos de 5 días, hasta cubrir los días de crecimiento a partir del brote de la pluma, en los días 8, 13, 18, 23, 28 de desarrollo. Las aves se alimentaron con concentrado a base de maíz amarillo, sorgo rojo y trigo, agua limpia a libre acceso, y se mantuvieron a temperatura ambiente. Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% con buffer salino de fosfatos (PBS) a pH 7.4 y Formol-amortiguado (Alibardi, 2007b; Alibardi, 2006; Alibardi, 2007a). Una vez fijadas las muestras se disecó la región del cálamo y se procedió a realizar los preparados histológicos.

6.2 Preparados histológicos

Preparados permanentes: se realizó el lavado de las muestras para la eliminación del exceso de fijador. La deshidratación se realizó con alcohol al 70%, 80% y 100% con dos cambios de cada uno; aclaración en xileno e infiltración en parafina a 60°C; estos tres pasos con el fin de remover el agua dentro del tejido y darle consistencia a la muestra con la parafina. Se hizo la inclusión con la misma parafina para darle volumen a las muestras. Posteriormente se realizaron los cortes transversales y longitudinales con un grosor de 5-7 μm . El montaje se llevó a cabo en portaobjetos con albúmina, en el baño de flotación (con

gernetina) y platina térmica para el desparafinado de las muestras (Ross & Wojciech, 2007; Estrada, Zamora, & Manzano, 1982). Las técnicas de coloración empleadas fueron las siguientes:

Tinciones: Hematoxilina-Eosina, Tricrómica de Gomori, Tricrómica de Cason, Azul de Toluidina (reacción metacromática),

Técnicas de histoquímicas: Azul Alciano, Ácido Peryódico de Schiff, Chévremont-Frederic y Rojo Oleoso O.

Finalmente se hizo la colocación del cubre objetos con resina sintética, Marca Hycel ®, en xilol al 60%.

6.3 Tinciones

Para la realización de las tinciones de H-E y tinciones específicas se hizo previamente el desparafinado de las muestras con xilol de 15 a 20 min y la rehidratación en concentraciones decrecientes de alcohol, comenzando con alcohol absoluto hasta el 70%, 5 minutos cada cambio.

Hematoxilina-Eosina

Tinción utilizada para observar la estructura general del tejido, marcando principalmente la diferencia entre el núcleo (basófilo) y citoplasma de las células (acidófilo) (Ross & Wojciech, 2007).

Procedimiento

Se sumergieron las muestras en hematoxilina de Ehrlich durante 6 a 15 minutos. Se lavaron en agua corriente por 2 a 5 minutos. La diferenciación se hizo en alcohol ácido al 1%, se lavaron brevemente en agua corriente. Se sumergieron en carbonato de litio, hasta que el tejido se observó azul brillante, se lavaron en agua destilada. Para contrastar, se utilizó eosina durante 15 minutos. Finalmente se deshidrataron las muestras, dos cambios de etanol al 95% cada uno, luego etanol absoluto y se hicieron dos cambios en xilol (Estrada, Zamora, & Manzano, 1982; Cediell, Cárdenas, García, Chuayre, Payan, & Sánchez, 2009).

Tricrómica de Gomori

Contrasta núcleos celulares, eritrocitos y cuatro tejidos básicos (epitelial, conectivo, muscular y nervioso).

Procedimiento

Se sumergieron las muestras en hematoxilina de Ehrlich de 5 a 10 minutos; se lavaron con agua destilada. Posteriormente se sumergieron en el colorante de Gomori 10 minutos. Se hizo el lavado en agua destilada. Finalmente se deshidrataron las muestras, dos cambios de etanol al 95% cada uno, luego etanol absoluto y se hicieron dos cambios en xilol (Estrada, Zamora, & Manzano, 1982).

Tricrómica de Cason

Contrasta núcleos celulares, eritrocitos, colágena y músculo.

Procedimiento

Se sumergieron las muestras en hematoxilina 10 minutos posteriormente se lavaron con agua destilada. Se colocaron en el reactivo colorante de Cason 5 minutos. Se hizo el lavado en agua destilada. Finalmente se deshidrataron las muestras, dos cambios en etanol al 95% cada uno, luego etanol absoluto y se hicieron dos cambios en xilol (Cason, 1950; Manus & Mowry, 1964).

Azul de Toluidina

Colorea a los núcleos (azules), mucina, matriz cartilaginosa y hialuronato (rojo-violeta) (Pescador, 2012; Ross & Wojciech, 2007).

Procedimiento

Se tiñeron las muestras con Azul de Toluidina al 1% hasta conseguir metacromasia, 2 minutos. Se realizó un lavado con agua corriente y posteriormente se lavaron con agua destilada. Finalmente se deshidrataron las muestras en alcohol, dos cambios en etanol al 95% cada uno, etanol absoluto y se hicieron dos cambios en xilol (Estrada, Zamora, & Manzano, 1982).

6.4 Técnicas de histoquímica

Azul Alciano

Tiñe mucosustancias ácidas, hialuronato y glucosaminoglucanos sulfatados.

Procedimiento

Se oxidaron las muestras de 5-10 min (ácido acético 3%), se tiñeron con Azul Alciano 10-15 min. Se lavaron con agua destilada. Posteriormente se tiñeron con rojo sólido 2 min. Se lavaron con agua corriente y finalmente se deshidrataron las muestras, dos cambios de etanol al 95% cada uno, luego etanol absoluto y se hicieron dos cambios en xilol (Estrada, Zamora, & Manzano, 1982).

Chévremont-Frederic

Para queratina cutánea y gránulos de queratina, por la presencia de grupos disulfuro; formándose un precipitado azul (Godlblum, Piper, & Campbell, 1954).

Procedimiento

Se agregaron 2 ml del reactivo Chévremont-Frederic al preparado, por 25 min. Se lavaron con agua destilada. Posteriormente se agregó rojo sólido de 1 a 5 min. Se lavaron con agua corriente y finalmente se deshidrataron las muestras, dos cambios de etanol al 95% cada uno, luego etanol absoluto y se hicieron dos cambios en xilol (modificado de Lillie F. R., 1954)

Ácido Peryódico de Shiff (P.A.S)

Tiñe carbohidratos y macromoléculas con abundancia de carbohidratos, se puede detectar glucógeno en las células, membrana basal y fibras reticulares del tejido conectivo (asociados a proteoglicanos) (Ross & Wojciech, 2007).

Procedimiento

Las muestras se oxidaron con Ácido Peryódico (5%) 5-10 min., se lavaron posteriormente en agua corriente 5 min, se lavaron brevemente en agua destilada. Se agregó el reactivo de Shiff de 15 a 30 min, se realizaron tres baños con agua sulfurosa o agua destilada y se lavaron durante 3 minutos en agua corriente. Se sumergieron tres minutos en Hematoxilina

de Ehrlich, se deshidrataron en alcohol absoluto y finalmente se sumergieron en xileno (Montero, 1997).

Rojo Oleoso O

Las grasas neutras se tiñen de rojo.

La fijación se realizó en formol-amortiguado (también se puede usar paraformaldehído neutro bufferado al 4% (Ulrich, 2010).

Procedimiento

De una solución madre de Rojo Oleoso O (0.5g) con isopropanol al 98% en 100 ml, se tomaron 6 ml y se mezclaron con 4 ml de agua destilada. Esta solución de trabajo, se dejó reposar 10 a 15 minutos y luego se filtró.

Se cubrieron los cortes obtenidos en el criostato y se dejaron secar al aire 10 minutos con la solución de trabajo. Se lavaron con agua destilada. Se lavó con agua y se hizo el montaje en gelatina-glicerina (Montero, 1997).

6.5 Fluorescencia

Para identificar mitosis se marcó el DNA utilizando DAPI (4,6 diamino-fenilindol) incluido en el medio de montaje para fluorescencia (Ultracruz ® Mounting Medium for fluorescence with DAPI, Santa Cruz Biotechnology).

Procedimiento

Se desparafinaron las muestras, se realizó un lavado con PBS, se colocó el medio de montaje y se puso el cubreobjetos.

6.6 Observación al microscopio

Para la interpretación de la muestra se utilizó un microscopio de Fluorescencia Marca Carl Zeiss, Modelo Axioscop Axio. Se tomaron las fotografías con una cámara digital Modelo Canon E05 1000D. Se utilizaron los aumentos totales: 100×, 200× y 400×.

VII. RESULTADOS

Se realizó la toma de muestras en los días 8, 13, 18, 23 y 28, se hicieron los preparados histológicos y se realizaron las tinciones mencionadas en la metodología. La observación al microscopio fue para cada tinción y por los días propuestos en la etapa de crecimiento de la pluma. Se procedió a analizar la estructura histológica del cálamo.

Morfología microscópica

Se observó que el filamento de la pluma a nivel del cálamo estaba constituido por: A) Una pared externa y B) Una cavidad, ocupada por un tejido interno.

A) Pared externa del cálamo

Constituida por un tejido epitelial de revestimiento de tipo estratificado escamoso queratinizado, este epitelio durante la etapa de crecimiento presentó cambios morfológicos para dar origen a la rama de la pluma, dentro de los elementos anatómicos que formó fueron: vaina, barbas, bárbulas y raquis.

Día 8: en los cortes transversales y longitudinales, se observó en el epitelio, la formación ligera de algunos pliegues a nivel del estrato basal. Desde éste último, hasta la región intermedia del epitelio se observó de manera dispersa, la presencia de unas células finamente largas, teniendo una forma aparentemente fusiforme, las cuales presentaron mayor apetencia tintorial con respecto a las demás células del epitelio, éstas características coincidieron con las de las células oscuras, que formaron posteriormente parte de la zona ramogénica y en donde se originaron las crestas de las barbas o de lengüeta. Con las tinciones de H-E, Tricrómica de Gomori, Chévremont-Frederic, Azul Alciano y Azul de toluidina, las células oscuras mostraron la misma coloración que la de la papila dérmica (Figs. 4, 5 y 6).

Los cortes longitudinales permitieron observar adecuadamente a las crestas de las barbas; la región proximal, estuvo constituida por células poco diferenciadas mientras que en la región distal las células, se observaron ya diferenciadas.

Con las tinciones de Azul de toluidina, Azul Alciano, los resultados fueron positivos en el tejido interno del filamento, haciendo suponer la presencia de algunas sustancias como

mucina, glucosaminoglucanos sulfatados, hialuronatos; sustancias que se encuentran presentes en el tejido conectivo (Figs. 4, 5 y 6).

Con las tinciones tricrómicas se identificaron principalmente tanto tejido epitelial como conectivo.

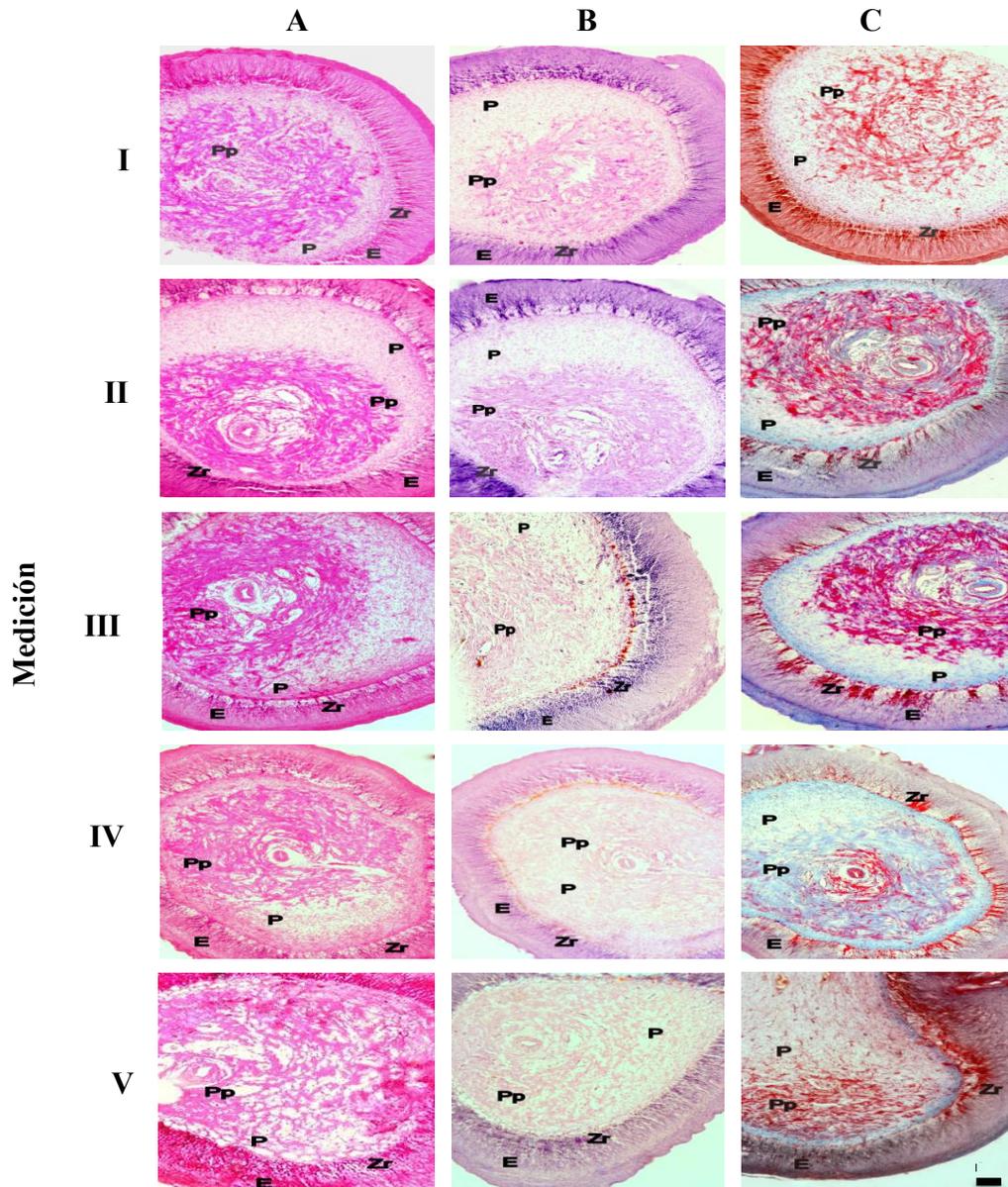


Figura 4. Componentes histológicos del filamento de la pluma a nivel del cálamo (1). Cortes transversales del cálamo de las plumas remeras: Día 8 (I). Día 13 (II). Día 18 (III). Día 23 (IV). Día 28 (V). H-E (A). tricrómica de Cason (B). Tricrómica de Gomori (C). Corte longitudinal del cálamo: Día 28 (V). Tricrómica de Gomori (C). Epitelio (E). Papila (Pp). Pulpa (P). Zona Ramogénica (Zr). Microscopio óptico. Barra, 500 μ m.

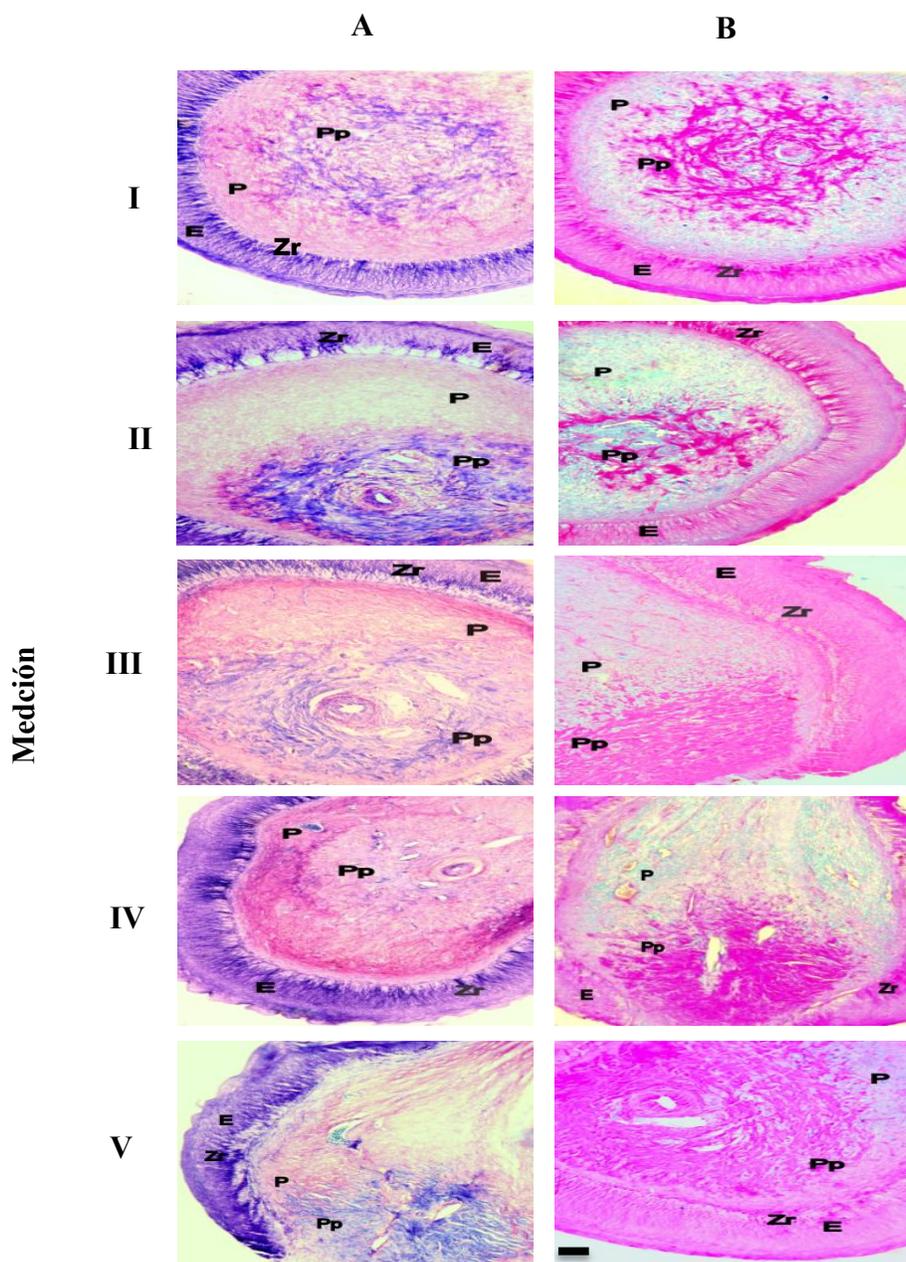


Figura 5. Componentes histológicos del filamento de la pluma a nivel del cálamo (2). Cortes transversales del cálamo de las plumas remeras: Día 8 (I). Día 13 (II). Día 18 (III). Día 23 (IV). Día 28 (V). Azul de Toluidina (A). Azul Alciano (B). Corte longitudinal del cálamo: Día 18 (III), Azul Alciano (B). Día 23 (IV), Azul Alciano (B). Día 28 (V), Azul de Toluidina (A). Epitelio (E). Papila (Pp). Pulpa (P). Zona Ramogénica (Zr). Microscopio óptico. Barra, 500 μ m.

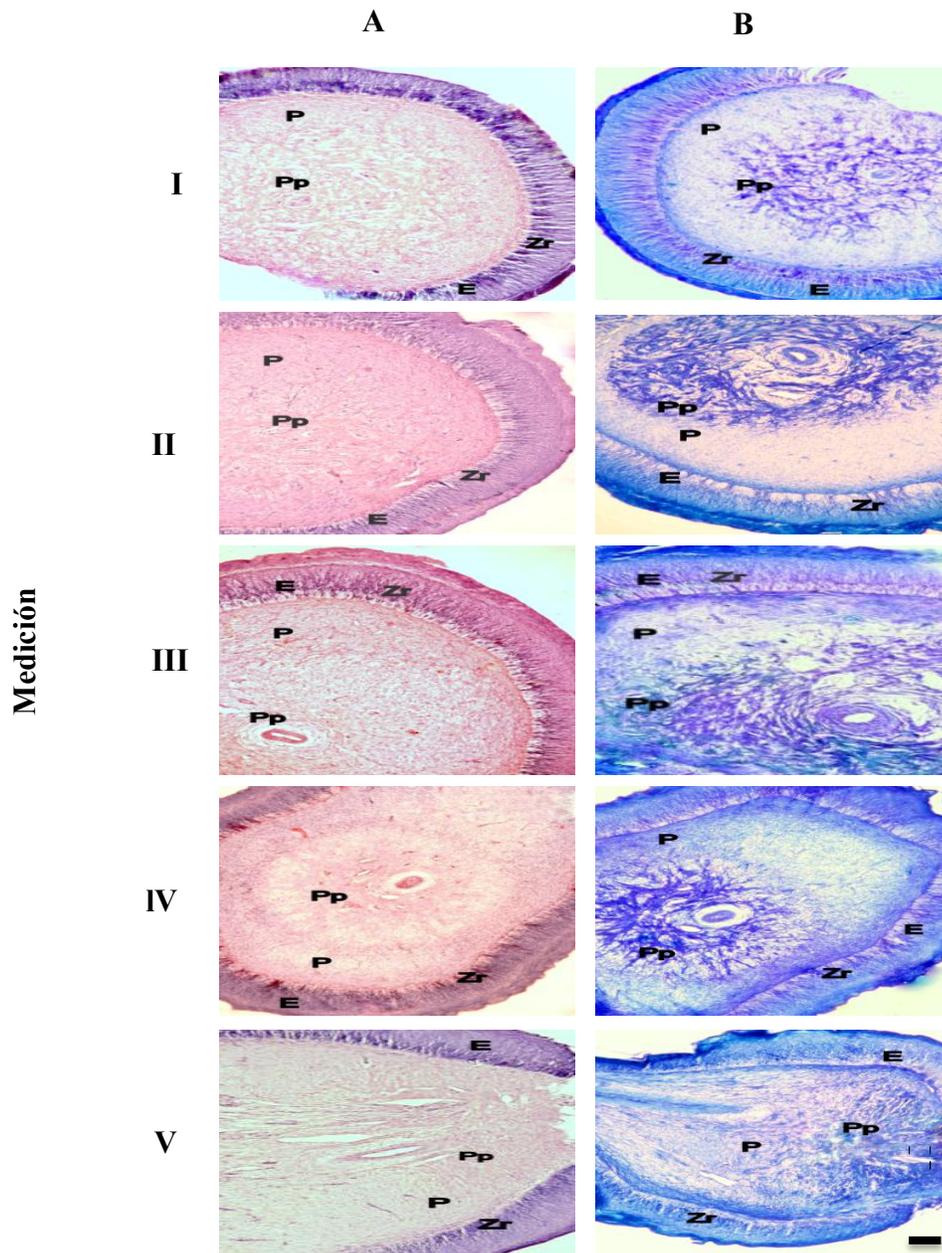


Figura 6. Componentes histológicos del filamento de la pluma a nivel del cálamo (3). Cortes transversales del cálamo de las plumas remeras: Día 8 (I). Día 13 (II). Día 18 (III). Día 23 (IV). Día 28 (V). Ácido Peryódico de Schiff (A). Chévremont-Frederic (B). Corte longitudinal del cálamo: Día 28 (V), Ácido Peryódico de Schiff (A), Chévremont-Frederic (B). Epitelio (E). Papila (Pp). Pulpa (P). Zona Ramogénica (Zr). Microscopio óptico. Barra, 500 μ m.

Con la tinción de Chévremont-Frederic se observó un aumento en la cornificación, que fue paulatinamente conforme crecía la pluma. También se observó la presencia de algunos melanocitos (Fig. 7).

Con la tinción de Ácido Peryódico de Schiff, la membrana basal del epitelio, presentó reacción positiva.

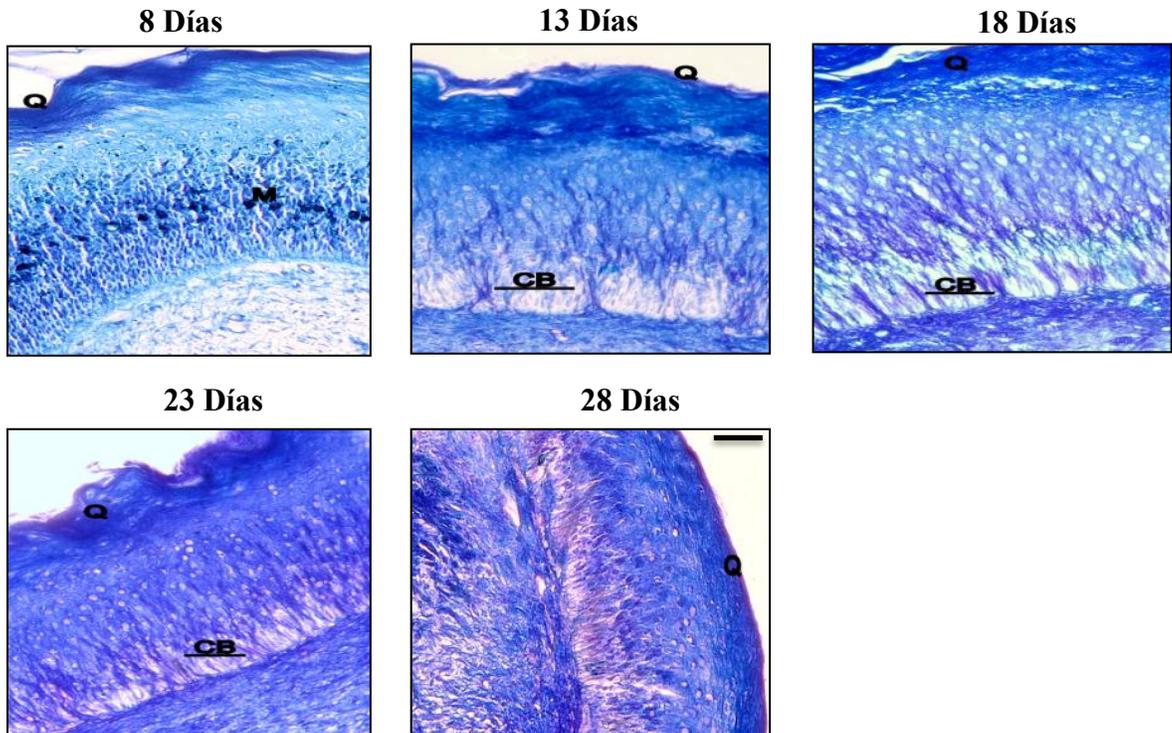


Figura 7. Aumento de cornificación. En los diferentes días de crecimiento (indicado en el borde superior). Crestas de las barbas (CB). Queratina (Q). Melanocitos (M). Tinción Chévremont-Frederic. Microscopio óptico. Barra, 250 μ m.

De los días 13 al 23, en los cortes transversales, cerca del estrato basal, fuera del epitelio, fue posible apreciar la neoformación de gran cantidad de vasos sanguíneos pequeños (Fig. 8), mientras que en la base del epitelio se observó mucho más marcado el plegamiento del estrato basal, empezándose a formar las crestas epidérmicas o de la barba (Fig. 9)

En el interior de cada cresta se observaron componentes celulares anidados, posiblemente para dar origen a las barbas, bárbulas y a la placa axial.

Las células del estrato basal y suprabasal, a nivel del ápice de la cresta, presentaron una apariencia clara y entre cada plegamiento se dispusieron las células oscuras ya mencionadas (Fig. 9)

En los estratos intermedio y superficial del epitelio, entre los queratinocitos, fue posible apreciar una serie de espacios redondeados, pequeños, con núcleos desplazados hacia un extremo, presentando aparentemente la forma de adipocitos (Fig. 9).

Por su parte, los melanocitos permanecieron entre las células de las crestas (Fig. 10)

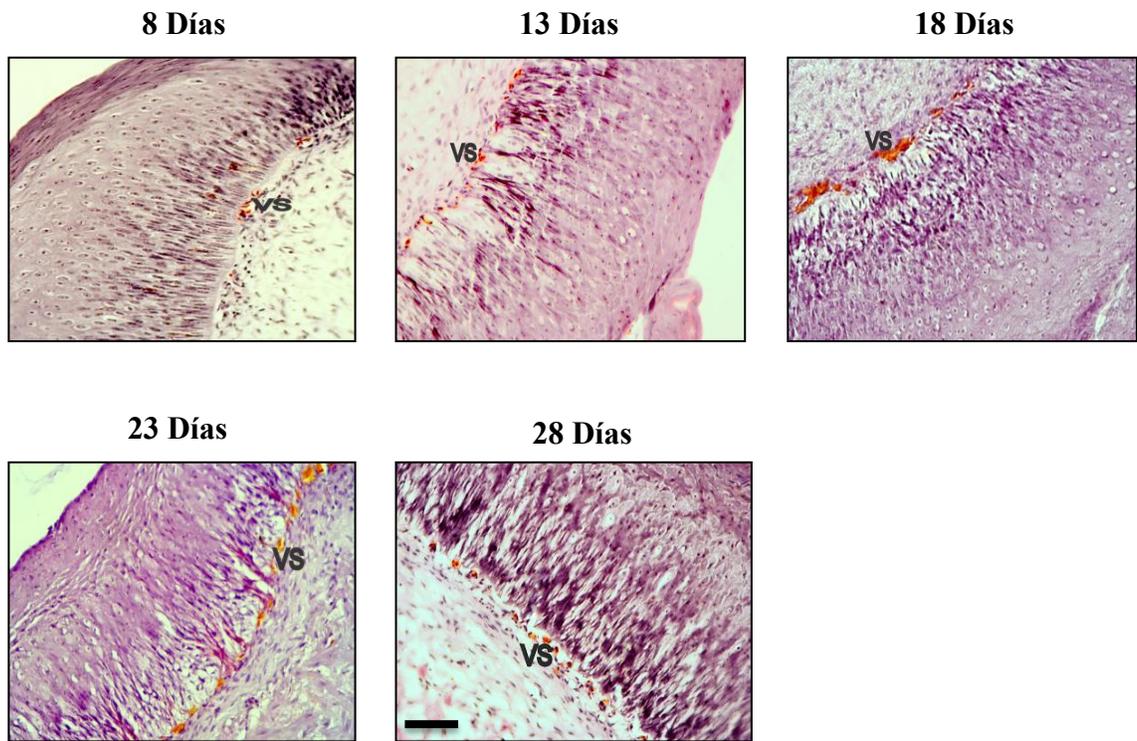


Figura 8. Neovascularización subepitelial. En los diferentes días de crecimiento (indicados en los bordes superiores). Aumentando a partir del día 13. Vasos sanguíneos (VS). Tinción Tricrómica de Cason. Microscopio óptico. Barra, 250 μ m.

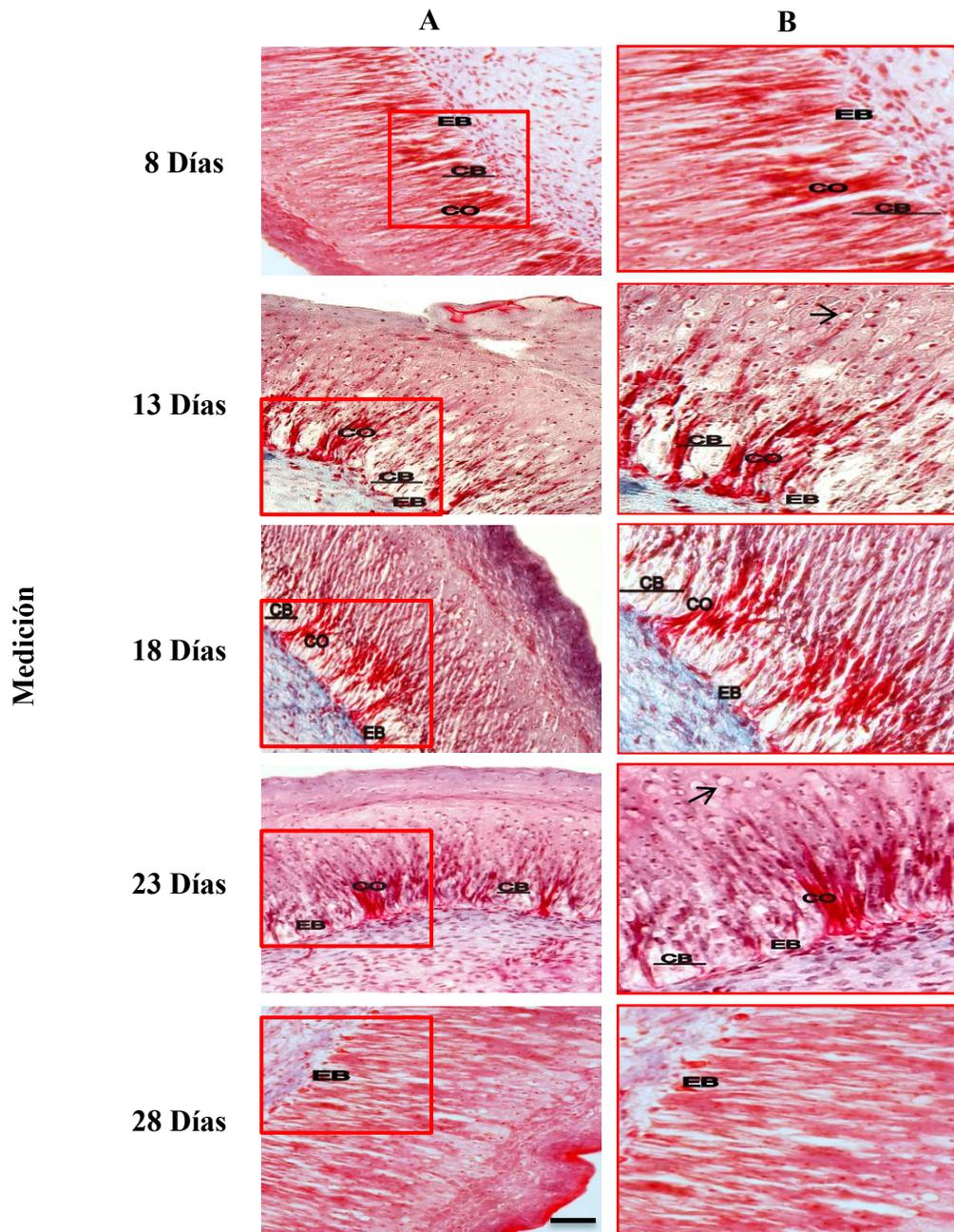


Figura 9. Cortes transversales del cálamo a nivel del epitelio. A la izquierda se indican los días de crecimiento, se observaron los cambios morfológicos a nivel del estrato basal del epitelio (**EB**) con la formación de las crestas de la barba (**CB**) entre éstas se observó la presencia de las células oscuras (**CO**). Las flechas señalan la presencia de posibles células adiposas. Amplificación de los recuadros de la columna **A** en la columna **B**. Tinción tricrómica de Gomori. Microscopio óptico. Barra, 250 μ m.

Los cortes longitudinales, abarcando desde la porción proximal del cálamo y a todo lo largo de éste, permitieron observar que en todas las etapas de crecimiento (días 8 al 23), las crestas de la barbas, en la región proximal del cálamo, estaban constituidas por una masa celular no diferenciada.

Así mismo, a lo largo del cálamo, a nivel de las mismas crestas, se fue observando la maduración de las células. En la base de cada cresta, en la zona periférica interna, se identificaron células escamosas, conforme se alargaban las crestas, se observó una transición de las células escamosas a células cuboides, y nuevamente en la región distal del cálamo, las crestas presentaron células escamosas, por cuya posición de las células se identificaron como células de la placa marginal. Esta capa delimitó a cada una de las crestas de lengüeta, de la pulpa central dérmica, del plegamiento del raquis y entre cada una de ellas.

Inmediatamente a la placa marginal, a partir de la zona cortical, del estrato intermedio, se dispuso otra capa de células cuboides, que también presentó una transición a células columnares, originando finalmente a las placas bárbulares. Tanto la placa marginal como las placas de células bárbulares rodearon toda la cresta; ambos estratos de células quedaron en las caras laterales de la cresta, uno en la cara proximal y otro en la cara distal, separados por un grupo de células que se dispusieron en el eje de la misma cresta, éstas últimas células formaron la placa axial (Fig. 10).

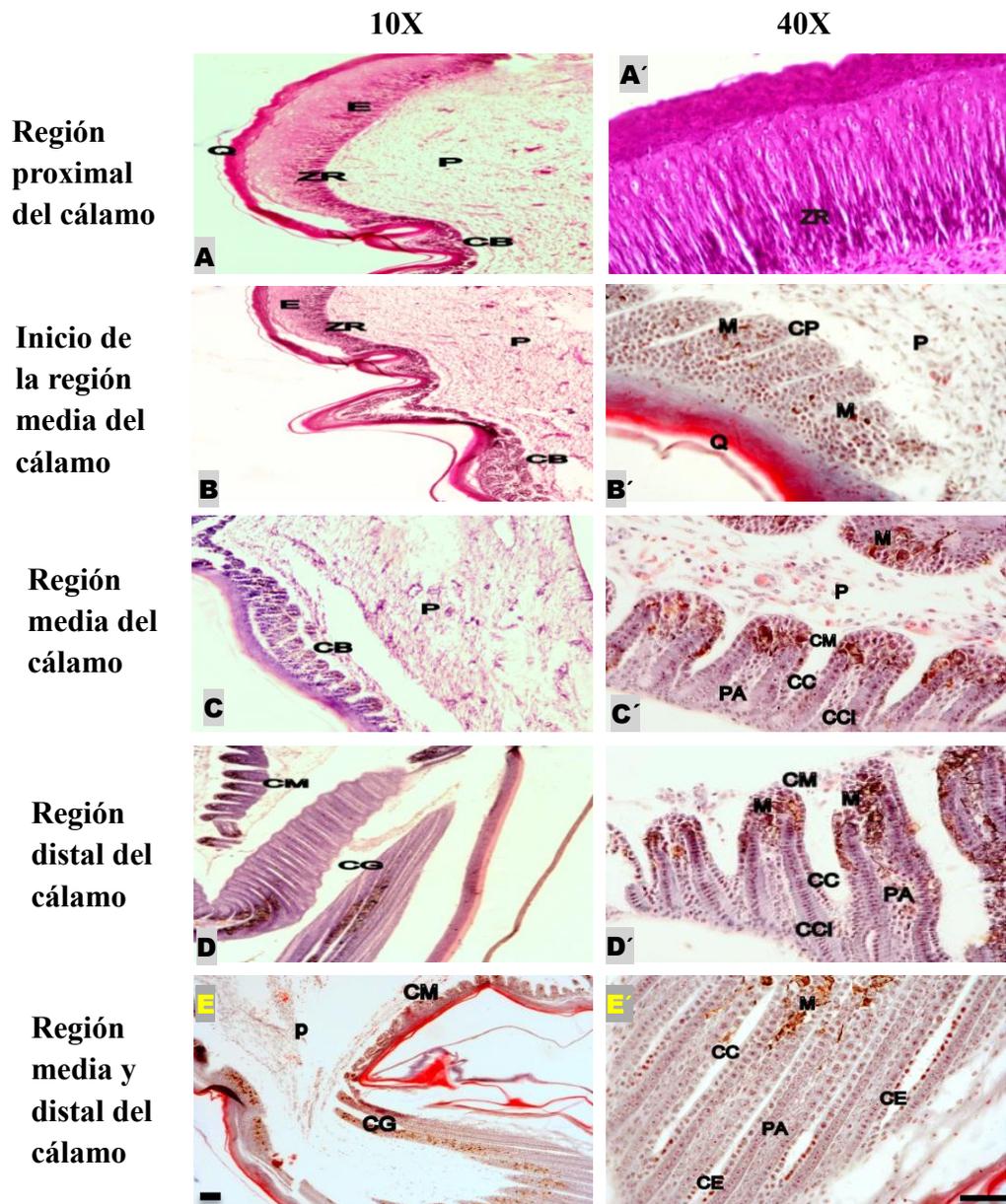
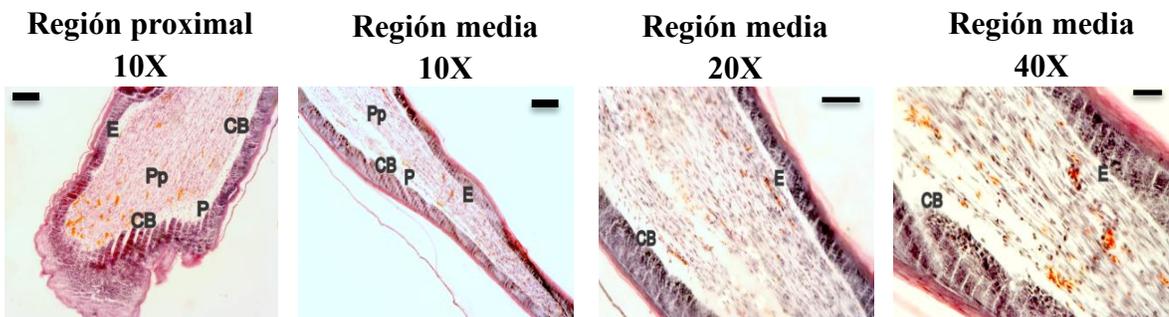


Figura 10. Características morfológicas de las crestas de las barbas. A lado izquierdo las diferentes regiones del cálamo, en los aumentos observados señalados en la parte superior. Región proximal del Cálamo con presencia de la zona ramogénica (ZR) (H-E, Ay A'). Inicio de la región media del cálamo con la presencia de crestas pequeñas, no diferenciadas (CP) (H-E, B y Tricrómica de Gomori, B'). Región media del cálamo con crestas medianas (CM) (Ácido Peryódico de Shiff, C y C'). Región distal del cálamo con crestas medianas (CM) (Ácido Peryódico de Shiff, D y D'). Región media y distal del cálamo con crestas medianas (CM) y grandes (CG) (Tricrómica de Cason, E y E'). Crestas de las barbas (CB). Células cuboides (CC). Células columnares (CCI). Células escamosas (CE). Epitelio (E). Pulpa (P). Placa axial (PA). Papila (Pp). Queratina (Q). Microscopio óptico. Barra, 500 μ m (10x). Barra, 250 μ m (40X).

Las muestras pertenecientes al día 28 de colección, mostraron que las crestas fueron disminuyendo en tamaño, tendiendo a desaparecer en el epitelio, en toda la longitud del cálamo, y disminuyó la presencia de las células oscuras (zona ramogénica) quedando nuevamente un epitelio estratificado escamoso queratinizado a nivel del cálamo (Fig. 11). En esta etapa se observó muy unida al epitelio la capa externa queratinizada que forma la vaina.

Tricrómica de Cason



Tricrómica de Gomori

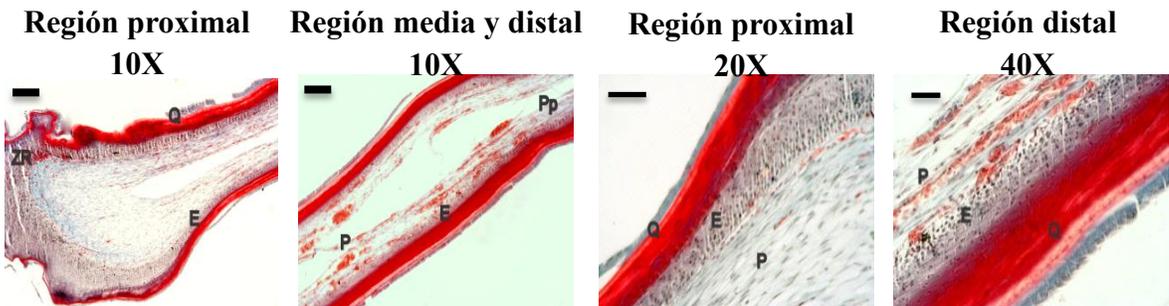


Figura 11. Cortes longitudinales del cálamo a diferentes niveles. Se muestra la disminución de tamaño y ausencia de las crestas de las barbas, en toda la longitud del cálamo; diferentes aumentos en los bordes superiores de los recuadros. Epitelio (E). Cresta de la barba (CB). Pulpa (P). Papila (Pp). Queratina (Q). Microscopio óptico. Barra, 500 μ m (10X). Barra, 250 μ m (20X). Barra, 125 (40X).

Por otra parte, en la zona de transición, entre la región distal del cálamo y el raquis, se observaron completamente diferenciadas las crestas de las barbas. Adquiriendo la estructura ramificada a partir de la barba. Al salir de la vaina, las barbas desplegaron las bárbulas (con células de morfología fusiforme) y, se expandieron hacia afuera para formar la veleta o vano (Fig. 12).

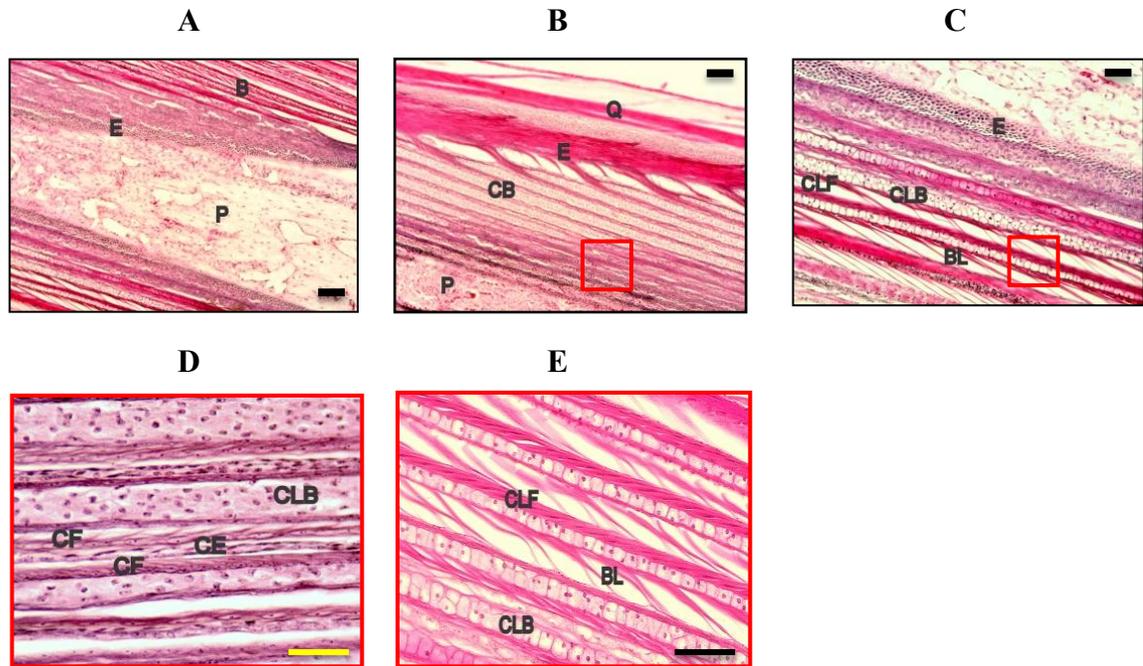


Figura 12. Zona de transición, entre la región distal del cálamo y el raquis. Corte longitudinal de las crestas de las barbas, Aumento de 10X (A, B, C). Amplificación de los recuadros de 12B y 12C, en las figuras 12D y 12E. Barba (B). Bárbula (BL). Epitelio (E). Cresta de la barba (CB). Células de la barba (CLB). Células escamosas (CE) Células fusiformes (CF). Pulpa (P). Queratina (Q). Tinción H-E. Microscopio óptico. Barra 500 μ m. Barra, 60 μ m.

Con respecto al tejido interno del filamento, se identificaron la pulpa y la papila dérmica. Se pudieron diferenciar una de otra por la densidad de coloración que presentó cada una.

B) Papila

En las imágenes obtenidas, esta estructura adquirió una coloración muy marcada, sus células fueron grandes y gruesas, su distribución fue compacta y se localizaron en la zona proximal del cálamo (cerca del ombligo proximal).

En las muestras provenientes del día 8 en estudio, las células presentaron una morfología fusiforme, con características similares a fibrocitos (células de forma fusiforme con núcleo de cara cerrada) y fibroblastos (células de forma fusiforme de cara abierta). Se observaron escasas células redondas y pocas células con prolongaciones.

En los días 13 al 23, se observó que las células fusiformes tendieron a disminuir en cantidad y tamaño, con relación al día 8, aumentaron las células de forma irregular, se observó claramente la presencia de células redondas con núcleos pálidos (Fig. 13).

Al día 28: Las células se observaron más pequeñas y con morfología irregular, se observaron células de forma redonda con núcleo pálido, entre éstas células se apreciaron espacios que presentaron núcleos desplazados hacia un extremo, dando la apariencia de adipocitos infiltrados (Fig. 13).

Con las tinciones Tricrómica de Gomori y Chévremont-Frederic, a nivel celular se confirmaron las características morfológicas que se encontraron con la tinción de rutina. Pero a partir del día 13, con la tinción Tricrómica de Gomori, claramente se observó la formación de fibras gruesas que empezaron a tomar una coloración azul, adquiriendo las características de fibras de colágena de un tejido conectivo maduro (adulto), colágeno laxo, disminuyendo las fibras de color rojo que se observaron en los primeros días de crecimiento (Fig. 14). Con la tinción de Chévremont-Frederic se encontraron escasas divisiones celulares (Fig.15).

C) Pulpa

De la misma forma que la papila dérmica, con las tinciones de H-E, Tricrómica de Gomori y Chévremont-Frederic se apreciaron claramente las características morfológicas de las células de la pulpa.

En las muestras pertenecientes al día 8 de evaluación, se observaron células fusiformes, muy finas y delgadas, con núcleos pálidos y oscuros, aparentemente similares a fibroblastos y fibrocitos; además se presentaron células de forma redondeada.

Al día 13, las células fusiformes presentaron prolongaciones, mientras que del día 18 en adelante, estas mismas células se observaron más pequeñas, y permanecieron presentes las células redondas; algunas células presentaron vacuolas en su citoplasma. Entre los componentes celulares se observaron algunos espacios con núcleos desplazados hacia un extremo, aparentemente similares a células adiposas (Figs. 13, 14 y 15).

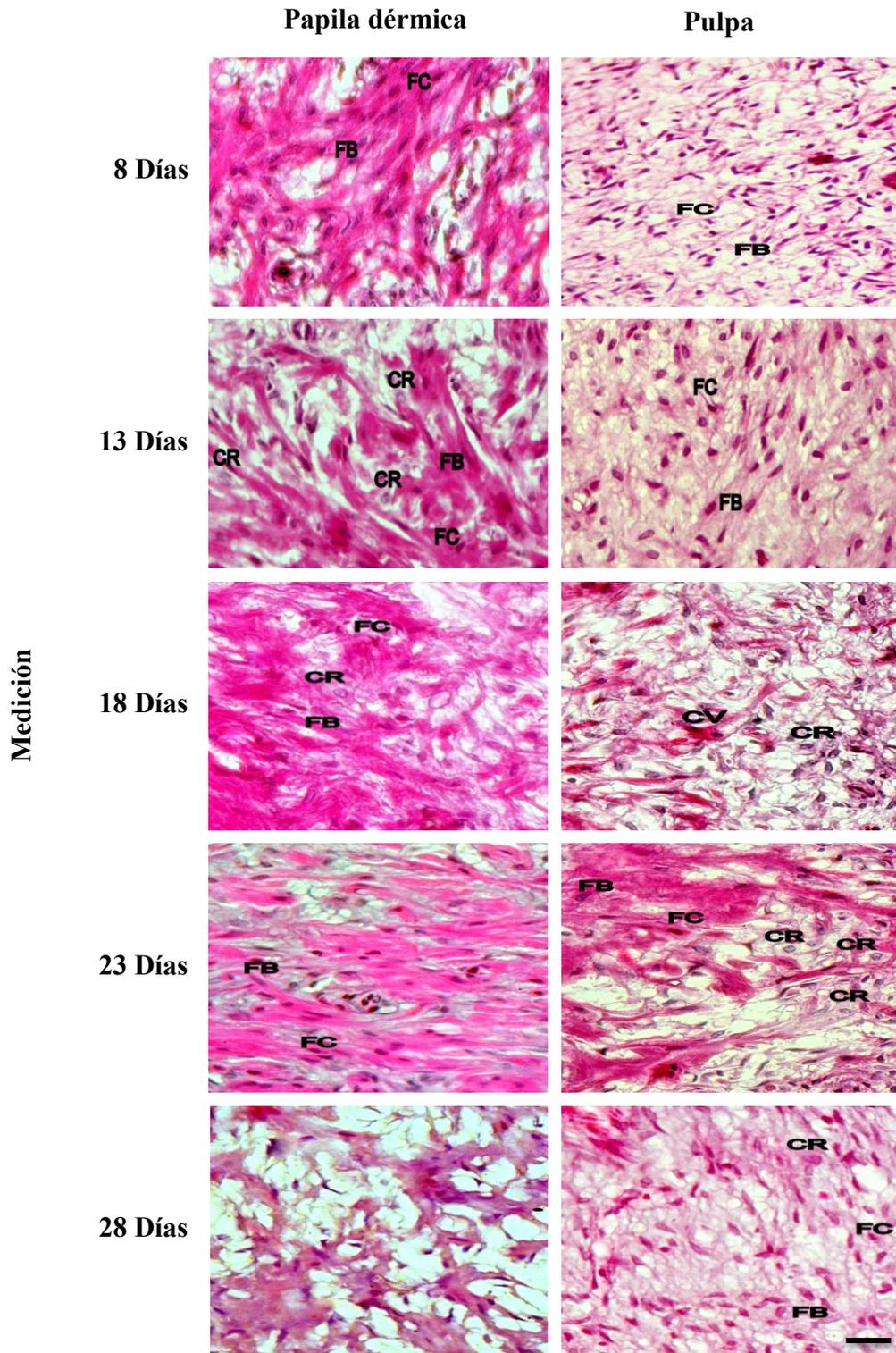


Figura 13. Elementos celulares de la Papila dérmica y de la Pulpa (1). A la izquierda se indican los días de crecimiento. Fibroblastos (FB). Fibrocitos (FC). Células redondas (CR). Tinción H-E. Microscopio óptico. Barra, 60 μ m.

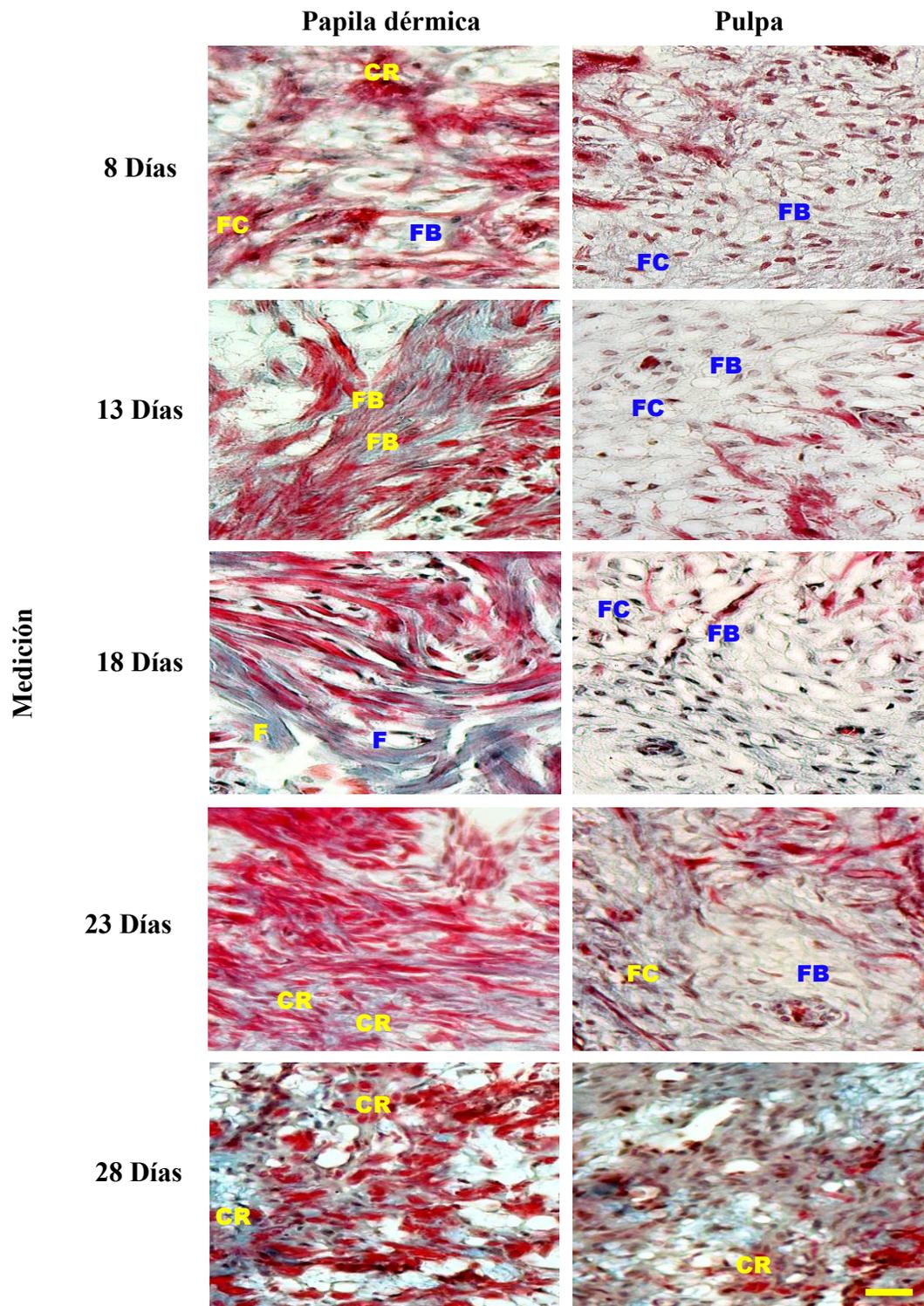


Figura 14. Elementos celulares de la Papila dérmica y de la Pulpa (2). A la izquierda se indican los días de crecimiento. Fibroblastos (FB). Fibrocitos (FC). Fibras (F). Células redondas (CR). Microscopio óptico. Tinción Tricrómica de Gomori. Barra 60 μm .

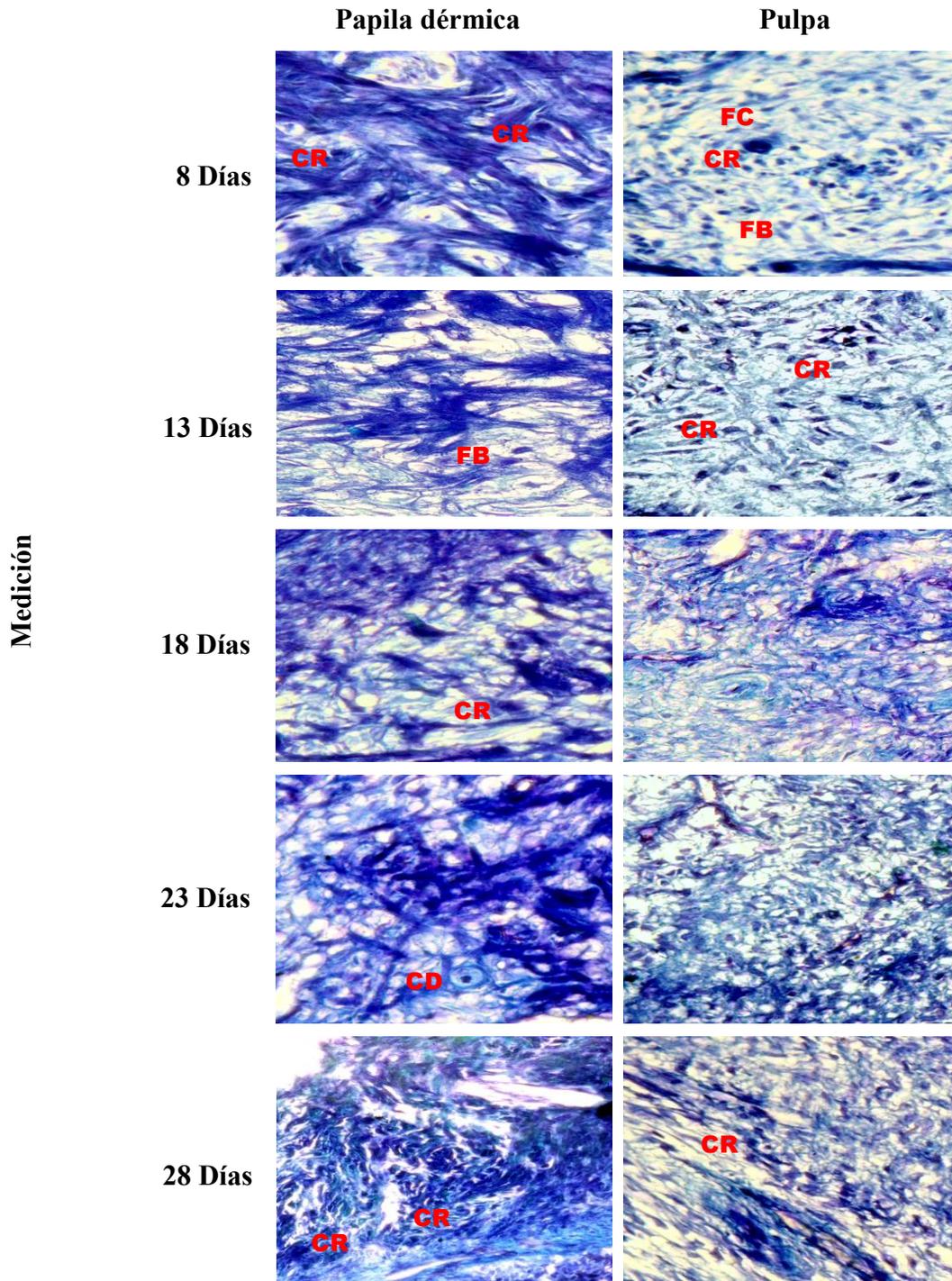


Figura 15. Elementos celulares de la Papila dérmica y de la Pulpa (3). A la izquierda se indican los días de crecimiento. Fibroblastos (FB). Fibrocitos (FC). Fibras (F). Células redondas (CR). Célula en división (CD). Tinción Chévremont-Frederic. Microscopio óptico. Barra, 60 μ m

Al evaluarse el epitelio para detectar células con mitosis, utilizando DAPI para marcar el DNA, se observó que las células del estrato basal e intermedio del epitelio del día 13, mostraron una mayor cantidad de células en división (Fig. 16).

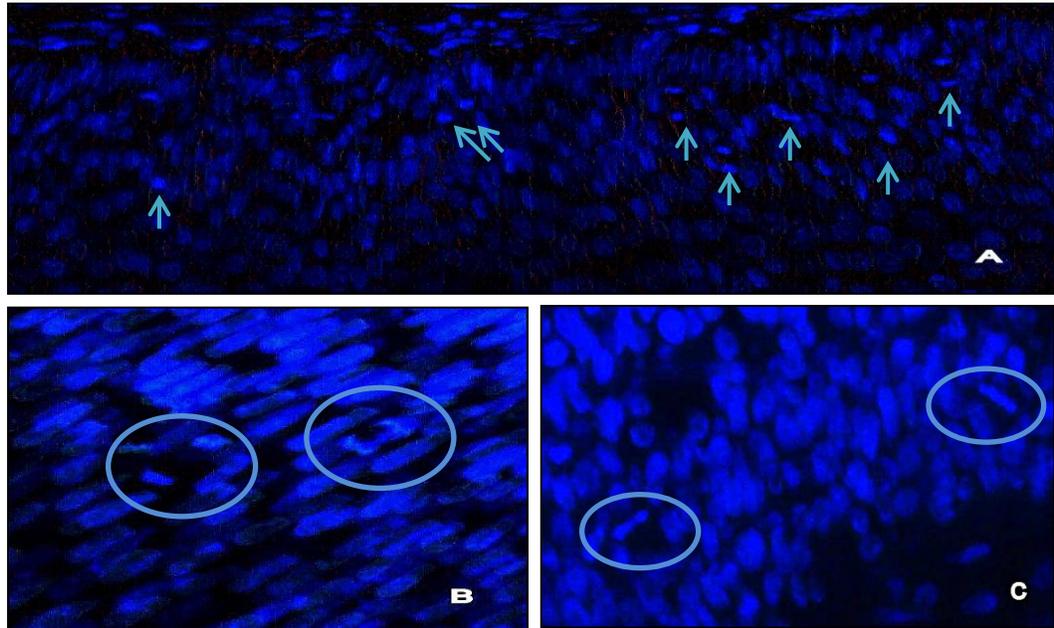


Figura 16. Microscopía de Fluorescencia con DAPI. Divisiones celulares (↑) en el estrato basal e intermedio, (A, 40X). Células en Anafase (B, 100X). Células en metafase (C, 100X).

Por otra parte, en ambos tejidos internos del filamento, en todas las etapas de crecimiento de las plumas, existió una reacción positiva con la técnica de Rojo Oil O (Fig. 17).

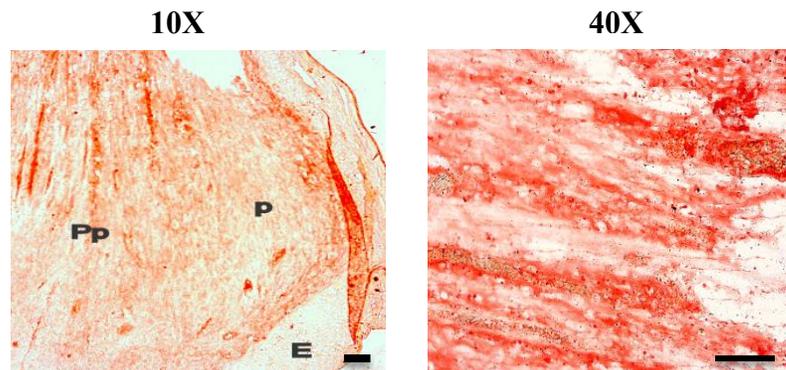


Figura 17. Reacción positiva a lípidos en la pulpa y la papila. Epitelio (E). Pulpa (P). Papila (Pp). Rojo Oil O. Microscopio óptico. Barra, 500µm (10X). Barra, 250 µm

En las tablas 1, 2 y 3 se resumen los elementos histológicos más importantes en el cálamo de las plumas remeras en los diferentes días de crecimiento, desde el brote al día 28; abarcando el epitelio, pulpa y papila.

Tabla 1. Valoración de las estructuras generales características del cálamo de la pluma de paloma.

Días de crecimiento	Zona ramogénica	Crestas de las barbas	Papila	Pulpa	Vasos sanguíneos
Día 8	+	+	+	+	+
Día 13	+	+	+	+	++
Día 18	+	+	+	+	++
Día 23	+	+	+	+	++
Día 28	+/-	+/-	+	+/-	+

+presente, ++aumentado, +/-disminuido.

En la tabla 1 se puede observar que la zona ramogénica, las crestas de las barbas, papila, pulpa y vasos sanguíneos estuvieron presentes en todas las etapas de crecimiento. Los vasos sanguíneos empezaron aumentar en el día 13 y disminuyeron en el día 28. La zona ramogénica y la pulpa también disminuyeron para el día 28. Las crestas de las barbas en ésta última etapa disminuyeron su tamaño, tendiendo a desaparecer.

En la tabla 2 se resumen los elementos histológicos del epitelio.

Tabla 2. Valoración de los elementos histológicos del epitelio del cálamo de la pluma de paloma.

Días de crecimiento	Crestas			Queratina	Mitosis
	Pequeñas	Medianas	Grandes		
Día 8	+	+	+	+	+
Día 13	+	+	+	++	++
Día 18	+	+	+	++	++
Día 23	+	+	+	++	+
Día 28	+	-	-	++	+

+presente, ++aumentado, +/-disminuido, -ausente.

En la tabla 2, se observa que las crestas tendieron a disminuir el día 28 hasta desaparecer, y la queratina también se fue acumulando en la vaina. Las divisiones celulares aumentaron a partir del día 13, disminuyendo hacia el día 23.

En la tabla 3 se resumen los elementos celulares de las crestas de las barbas y de la zona ramogénica.

Tabla 3. Valoración de los elementos celulares del epitelio de la pluma en crecimiento de paloma.

Células	Placa marginal	Placa barbular	Placa axial	Zona medular o de la barba	Zona ramogénica
Escamosas	+				
Cuboides	+	+			
Columnares		+			
Fusiformes		+			
Alargadas			+		
Células oscuras					+
Células poliédricas				+	
+presentes					

Con relación a la forma celular, en la tabla 3 se puede apreciar que las células de la placa marginal y placa barbular, presentaron una transición morfológica, esto en comparación con las células presentes en la placa axial, zona de la barba y la zona ramogénica, en donde se mantuvieron estables las formas celulares.

En la tabla 4 se resume los elementos celulares en la pulpa y la papila dérmica. Así, se observa que tanto las células fusiformes y redondas estuvieron presentes en la pulpa y papila dérmica en toda la etapa de crecimiento, mientras que las células redondas de la pulpa aumentaron el día 13 y que las células fusiformes de la misma pulpa disminuyeron el día 28.

Tabla 4. Células de la pulpa y papila dérmica de la pluma de paloma.

Días de crecimiento	Células de la Pulpa		Células de la Papila	
	Células Fusiformes	Células Redondas	Células Fusiformes	Células Redondas
Día 8	+	+	+	+
Día 13	+	++	+	+
Día 18	+	+	+	+
Día 23	+	+	+	+
Día 28	+ -	+	+	+

+presente, +-disminuido, ++aumentado.

VIII. DISCUSIÓN

En éste estudio se caracterizó histológicamente el cálamo en crecimiento de plumas remeras de palomas mensajeras. Con relación a los resultados obtenidos, se observó que para la regeneración de las plumas es importante la formación de las estructuras denominadas crestas de las barbas o de “lengüeta,” concordando con estudios previos realizados por Bragulla & Hirschberg (2003) y Alibardi (2006, 2007a); nuestras observaciones mostraron que las crestas se formaron a partir del epitelio estratificado escamoso queratinizado, que conformó la pared del filamento de la pluma. Lo anterior coincide con Lin, et al., (2013), además de que cada cresta se encontró perfectamente delimitada, concretamente en los cortes longitudinales se observaron dispuestas como columnas y en los cortes transversales como celdas.

En el periodo de desarrollo en estudio del día 8 hasta el día 23 de crecimiento, en el interior del cálamo, a nivel de su extremo proximal, se observó que las crestas de la barba o de lengüeta estaban poco diferenciadas, estando formadas por una masa celular, en donde no se apreciaban las características morfológicas celulares. Cada una de estas crestas, presentó un alargamiento, siendo crestas de tamaño pequeño en la región proximal del cálamo y, en la región distal, crestas de tamaño mediano y grande. Las crestas pequeñas eran las que presentaron poca diferenciación celular. En el interior de las crestas medianas y grandes se observaron estratos celulares bien definidos. Algunas de éstas características, coincidieron con Alibardi (2006, 2007b), en sus estudios realizados en animales adultos, en codorniz, zebra finch y pollo, en las plumas del ala. Cerca de la base del folículo y en la longitud de la pluma; observó en la región basal de las crestas de lengüeta, situadas en la región próxima de la pluma, que la epidermis permaneció poco diferenciada. Hacia lo largo del filamento, encontró columnas paralelas de células, rodeadas por una vaina. Estos pliegues epidérmicos constituidos por cordilleras de células, se fueron alargando más hacia la punta de la pluma, a nivel del folículo o hasta su desembocadura; las crestas de lengüeta se caracterizaron por ser alargadas y curvadas. Según Alibardi (2007b), no se tiene el conocimiento de la organización celular en las crestas de lengüeta de la barba.

Maderson et al., (2009) describe en embriones, que las crestas de lengüeta sólo están representadas por ranuras longitudinales en la superficie luminal del cálamo, sin existir una individualización completa por la pérdida de adhesividad que se da al formarse la rama.

En este estudio, en el cálamo de las palomas, la formación de las crestas, inició a nivel del epitelio, con la presencia de la zona ramogénica, constituida por células oscuras (estas células no han sido estudiadas totalmente, recientemente se empieza a describir el origen de las mismas). De manera notoria con algunas de las tinciones realizadas, las células oscuras adquirieron la misma coloración que las células de la papila, esto posiblemente apoye su origen a partir de las células de la papila dérmica, respaldando lo reportado por uno de los primeros estudios que ha hecho Alibardi (2010), sobre éstas células; quien observó una migración de las células del tejido conectivo, señalando que son células de la papila dérmica; aunque no aclara completamente si son realmente células de la papila, por lo que probablemente pudiesen ser consideradas que fueran células de la pulpa. Por lo tanto podemos afirmar que la formación de las crestas inició por un plegamiento del epitelio o como cita Maderson, et al., (2009) por un reordenamiento de las células epiteliales.

Por otra parte varias de las características celulares de las crestas de las barbas, coincidieron con estudios previos realizados por Alibardi, (2007a), Prum & Dyck, (2003), Sawyer, et al., (2005) y Yue, et al., (2006), durante la formación de las crestas, el estrato basal quedó dispuesto de manera periférica en la región interna del cálamo, rodeando por completo a las crestas, mientras que en el interior de las mismas, a partir del estrato celular intermedio, se formaron la zona medular y cortical, ésta última, dividida en las placas laterales de las bárbulas y una placa axial. Así mismo, que la zona medular, se observó como una estructura nodular en el ápice de la cresta, adyacente a la capa marginal; las placas laterales de las bárbulas se dispusieron en la cara proximal y distal de la cresta, uniéndose al eje que formó la zona medular (barba) de la cresta, en toda la longitud del mismo. La placa axial se dispuso entre las placas laterales, quedando medialmente en toda la longitud de la cresta, separando una placa de otra.

En cuanto a las variaciones que se encontraron con los estudios realizados por los investigadores antes mencionados, éstas fueron en la morfología celular. En el caso de la

placa marginal, en la región más cercana a la base de las crestas, se observó la presencia de células escamosas y que, conforme se dio el alargamiento de las crestas se presentó una transición a células cuboides, confirmando lo descrito por Alibardi (2009) quien observó en la plumas del zebra finch células escamosas a cuboides en el cuello del folículo continuándose en la placa marginal como células columnares, ya que en este estudio observamos que la porción más distal del cálamo, presento nuevamente células escamosas. Este último investigador también reportó que durante la maduración de las crestas, en embriones de 15 a 17 días de la deposición, las células cilíndricas de la placa marginal perdieron su actividad y permitieron la separación de las barbas. En nuestro trabajo en las crestas de las barbas de las palomas adultas, las células escamosas de la placa marginal, se pierden al ir madurando las crestas.

En relación a las placas barbulares hubo cierta transición celular, de acuerdo al tamaño de las crestas; en las crestas pequeñas se alcanzó a ver un epitelio simple cuboide, mientras que las crestas medianas y grandes presentaron un epitelio simple cuboide a columnar. Hasta lo que sabemos esta transición no ha sido reportada en las placas barbulares, presentándose un solo estrato de células, que cubrió ambas caras de la cresta. En los estudios de Alibardi (2007c), en el zebra finch, la placa barbular, cerca de la zona de la barba, presentó un solo estrato de células barbulares y en zonas más periféricas de las crestas se observó diestratificado; con una morfología celular fusiforme. En nuestro trabajo encontramos que la placa axial, compuesta de células alargadas (células de la cresta de “paleta”), tendieron a desaparecer a nivel de las crestas ya ramificadas (crestas en la región más distal del cálamo); de acuerdo con lo reportado con Bragulla (2003) y Prum (2003), quienes las identifican como un tipo de células de apoyo; que se caracterizan por presentar también un proceso de lipogénesis y posterior desintegración, lo que deja solo unidas las regiones queratinizadas en las crestas, perdiéndose así su relación con las células bárbulares y permitir la separación entre cada una de las células, para originar a las bárbulas. En éste trabajo fueron las únicas células de apoyo que se percibieron claramente, ya que se ha descrito otro tipo de células de apoyo, las células de la cuña que se localizan en la placa marginal de las crestas largas de las plumas pennaceus en regeneración; estas son células

que actúan como espaciadores de las crestas de lengüeta y participan en la cornificación, entre las crestas que se ramifican, a partir del raquis, pero posteriormente son desprendidas como perlas córneas después de la caída de la vaina (Alibardi, 2007c). En este estudio, algo similar sucedió con las células de la barba, las cuales presentaron un hinchamiento, aparentando un proceso de muerte celular.

Al igual que lo observado por Prum (2003), durante el crecimiento de la pluma, la queratina fue aumentando y se fue acumulando a nivel de la vaina, lo que no permitió diferenciar entre la pared del cálamo y la vaina; absorbiéndose la vaina por completo en la pared del cálamo.

Esta serie de cambios morfológicos nos muestran que en el crecimiento de la pluma se dio una proliferación, diferenciación y muerte celular. Las células que iniciaron la proliferación estuvieron alojadas en el epitelio de la región proximal, diferenciándose en crestas pequeñas, menos diferenciadas y presentando un crecimiento hacia la región distal, quedando más diferenciadas. Realizándose una maduración próximo-distal del filamento de la pluma. El crecimiento por lo tanto abarcó, a nivel del epitelio, la presencia de la zona ramogénica, que dio origen a las crestas de las barbas. Así mismo estas crestas presentaron cambios morfológicos en sus componentes celulares, al darse la diferenciación; iniciando con las modificaciones en el estrato basal del epitelio, realizándose el plegamiento del mismo, formando la placa marginal, estando constituida de una capa de células cuboides en las crestas medianas. En las crestas más grandes y diferenciadas se observaron las células escamosas, cuboides y nuevamente escamosas, presentándose éste epitelio desde la base de las crestas. Como ya se mencionó, esta transición hasta donde se sabe no ha sido reportada pero puede relacionarse con lo observado por Chang et al. (2004), donde observó a nivel del raquis y en las crestas de las barbas, una diferenciación terminal, presentándose queratina A; señalando un proceso de apoptosis en las células (el refiere que la apoptosis con diferenciación terminal puede formar estructuras temporales o permanentes). También observó que la placa axial y la placa marginal fueron de las primeras estructuras que presentaron muerte. En la etapa temprana de diferenciación de las crestas, encontró que las células eran cúbicas, señalando que en esta etapa las células proliferaron y que la muerte de

las células, regula la cantidad de la población celular del epitelio, permitiendo la presencia de una sola capa. En la etapa tardía cuando las células barbules se someten a diferenciación terminal, las células de la placa marginal se vuelven planas, ya que no realizan una queratinización, señalando que estas células presentan apoptosis. Finalmente la diferenciación de las células de la placa marginal de las crestas cercanas al raquis, crean espacios al morir permitiendo que las células barbulares (bárbulas) de toda la rama se liberen. De ésta manera nuestros resultados concuerdan con lo descrito por Chang y también nos hace suponer que lo que observamos, principalmente la presencia de las células escamosas, en la base de las crestas de mayor tamaño y diferenciadas, cerca de la zona de transición con el raquis, es por el proceso de apoptosis que probablemente inicia en esta región de la cresta (base), por lo tanto se observa este epitelio simple con células escamosas, cuboides y escamosas nuevamente permitiendo la separación de las células barbulares. En el caso de la placa axial en etapa temprana está presente y en etapa tardía desaparece, dejando un espacio entre las placas barbulares. En cuanto a las células de la placa barbular, en este mismo estudio, Chang menciona que las células, se vuelven voluminosas realizando un proceso de diferenciación terminal; en este proceso las células producen α o β queratinas en la etapa tardía y cuando abunda una de estas queratinas en las células, se convierten en corneocitos, similar a lo que ocurre en células epidérmicas de mamíferos, sucediendo esto principalmente en la vaina de la pluma. Cuando la β queratina es dominante y adquiere una forma de andamio, las células se vuelven queratinocitos y forman las estructuras permanentes (como el pelo en el caso de los mamíferos). En el caso de la pluma esto sucede en las células de la placa barbular que originaran a las bábulas. Con estos datos podemos decir que en nuestro estudio, la transición de las células de la placa barbular se dio por la acumulación de la queratina en el citoplasma, adquiriendo una forma celular cuboide, posteriormente columnar y finalmente fusiformes. Las células de la barba en nuestro estudio presentaron muerte, al realizar un hinchamiento las células, podríamos suponer una muerte parecida a la de los condrocitos en el cartílago, denominado oncosis, proceso en cual se da un hinchamiento de la célula, cariorexis y cariólisis; en el

caso de las células de la barba dejan un vacío a todo lo largo del brazo de la barba, para dejar hacer menos pesada a la pluma (Chang, 2004; Van 2002).

A nivel de la vaina se realiza una diferenciación terminal con la formación de corneocitos, en este proceso se da la proliferación celular en el estrato basal del epitelio y en el caso de mamíferos se forman los gránulos de queratohialina, estos gránulos formados por profilagrina unidos al citoesqueleto, conducen a la agregación de la queratina. También se forman gránulos lamelares cuya exocitosis libera material lipídico alrededor de las células, contribuyendo a la barrera epidérmica, otras proteínas se expresan en este proceso, por ejemplo, loricrina e involucrina (Bragulla & Homberger, 2009). En las capas más superiores se producen glicosilceramidas y esfingolípidos. Todas estas sustancias permiten que las células estén dispuestas en forma de ladrillos. En el caso de la pluma se origina finalmente la vaina en el epitelio.

Por otra parte, observamos que en la base del epitelio, externamente a éste, se presentó una neovascularización en los días 8, 13 y 18, tendiendo a aumentar a partir del día 13, coincidiendo con las divisiones celulares en el interior del epitelio, que fueron en mayor grado el día 13.

En nuestro caso, para la identificación de la papila dérmica y la pulpa, se consideraron las características histológicas de cada una, tomando en cuenta las características de las células y de la matriz extracelular. En la papila se observaron células fusiformes grandes, de citoplasma muy acidófilo, también se observaron células redondas de núcleo pálido y células de forma irregular; hubo poca matriz extracelular, con fibras muy grandes y gruesas, en comparación con las de la pulpa. En esta última al comparar las células fusiformes con las de la papila, éstas eran más pequeñas y de citoplasma fino, también se presentaron células redondas y de forma irregular, siendo su matriz extracelular más abundante y de apariencia más laxa. Adicionalmente, tanto en la papila y la pulpa, algunas de las células redondas y de forma irregular presentaron vacuolas en su citoplasma y otras presentaron citoplasmas muy claros. Esto nos hace suponer que las células pudieran realizar un proceso de maduración y que en las últimas etapas de crecimiento tienden a desaparecer

y/o sufren una diferenciación a células de tejido adiposo, siendo esto más marcado en las células de la pulpa. Por otra parte, la reacción positiva a sustancias como mucina y glucosaminoglicanos sulfatados nos confirman la presencia de un tejido conectivo. Con relación a lo citado por Lin *et al* (2013), nuestros resultados coinciden en que la papila es una matriz compacta hacia la base del cálamo y la pulpa es una matriz laxa con alta vascularización, existiendo una relación entre ambas. Inclusive dicho autor, describe divisiones celulares a nivel de la papila (en este estudio fueron casi nulas), lo que hace suponer que en las etapas tempranas de crecimiento las células de la pulpa puedan tener su origen a partir de las divisiones celulares; describiendo que las células resultantes de las divisiones celulares son de forma redondeada con núcleo pálido, presentando filamentos de vimentina. Siendo esta proteína requerida para las funciones de la pulpa, por lo tanto son células que pueden ser marcadas con vimentina, mientras que algunos fibroblastos en la base de la pulpa reaccionan al marcaje con anti-desmina. Lin *et al* (2013) menciona también, que las papilas dérmicas de diferentes folículos no son equivalentes y por lo tanto las células que las forman no son iguales. Otra característica importante que menciona, es que la papila dérmica es permanente y que la pulpa crece cíclicamente durante el crecimiento, presentando posteriormente, una regresión al final del mismo. Este último dato se pudo comprobar en el presente estudio, obteniendo el mismo resultado, observando que las células de la papila tendieron a ser más pequeñas, que al inicio del crecimiento y las células de la pulpa tendieron a desaparecer.

Otras características que se observaron en nuestra investigación, y que no se han reportado, es que en el epitelio del cálamo en el día 13 de crecimiento se presentó mayor grado de divisiones mitóticas, coincidiendo con lo observado en las células de la pulpa para esta misma etapa; las características de las células originadas eran parecidas a la de fibroblastos, con la presencia de prolongaciones citoplasmáticas, es decir presentaron una forma más estrellada; indicativo de que tienen mayor actividad de secreción, haciendo suponer que posiblemente existe una relación de ambas estructuras, epitelio-pulpa. Lin *et al* (2013), menciona que las células de la pulpa aparentemente se originan a partir de la papila; también señala que cuando una pluma se retira con fuerza por el punteo, el ectodermo

papilar suele ser preservado en el folículo y se mantiene conectado con la papila dérmica; induciendo a la proliferación celular en el ectodermo papilar y a su vez en la diferenciación de la zona de ramogénesis. Esto se puede respaldar con estudios previos que se han realizado, sobre la regeneración de la pluma, algunos de estos estudios fueron realizados por Wan y Lillie (1943, 1944) ya que observaron que las células de la papila dérmica tienen una función inductiva hacia el epitelio en las plumas de pollo. Se ha demostrado que cuando la papila dérmica se retira, ya no se regenera la pluma. A fin de probar la propiedad inductiva de la papila dérmica, se utilizó una papila dérmica donante, la cual fue cuidadosamente microdisecada para quitar el epitelio adjunto y fue trasplantada a un folículo receptor donde la papila dérmica y el ectodermo papilar se eliminaron. Se reveló que la papila dérmica trasplantada inducía la regeneración de la pluma en el folículo receptor. Además de la inductividad de la papila dérmica post-natal, en otro trabajo que realizaron, solo utilizaron la mitad de la epidermis del folículo, la cual permitió la regeneración del folículo; mientras que la dermis intrafolicular no era capaz de regenerar nuevos folículos plumosos. Por lo tanto se ha concluido que la papila dérmica de la pluma puede inducir al epitelio para la regeneración de la pluma, influyendo en la simetría y orientación de la nueva pluma (Matthew *et al*, 2004).

Finalmente, para el día 28 de crecimiento, en el cálamo de las palomas en estudio, nuestros resultados mostraron que las crestas tendieron a desaparecer gradualmente en toda la longitud del cálamo y la pared del epitelio se volvió plana, finalizando la etapa de crecimiento de la pluma e iniciando la maduración de la misma. Éste proceso apoya lo reportado por Alibardi (2007c), en donde la formación de las crestas de las barbas, se detiene en la parte más inferior en el folículo, tendiendo a reducir progresivamente a un epitelio plano y a nivel en la parte inferior del cuello del folículo, la zona ramogénica desapareció dejando también un epitelio escamoso. También encontramos que en la zona de transición entre el cálamo y raquis se presenta la ramificación de las barbas, presentando las células bárbulares una morfología fusiforme, con diferentes grados de unión, hasta quedar totalmente separadas. Alibardi encontró algo semejante en estudios realizados en pollo adulto, zebra finch y codorniz; esta separación según Alibardi (2007c, 2010, 2011)

puede derivar de la creación específica de uniones celulares entre las células de la barba/bárbula, excluyendo a las células de apoyo, ya que estas últimas células degeneran posteriormente, aparentando no tener relación con las células de la barba y barbulares.

IX. CONCLUSIONES

1. Se hizo la caracterización histológica del cálamo de las plumas remeras durante la etapa de crecimiento en palomas adultas.
2. Los elementos estructurales mantuvieron en general las mismas características histológicas de acuerdo a lo reportado en la literatura.
3. El estudio de manera secuencial de diferentes etapas del crecimiento de la pluma, permitió identificar por primera vez que:
 - a) En la base de las crestas a nivel de la placa marginal, en cualquiera de las etapas de crecimiento, se presentan células de morfología escamosa; a lo largo de las mismas, las células tienen morfología cuboide y en la zona de transición entre el cálamo y raquis, nuevamente las células son de morfología escamosa.
 - b) A nivel de las placas barbulares, en las crestas pequeñas se presenta un solo estrato celular de morfología cuboide; durante el alargamiento de las mismas crestas se presentaron células de morfología cuboide y columnar; en la zona de transición entre el cálamo y raquis las células son de morfología fusiforme.
 - c) Las células oscuras de la zona ramogénica, se identificaron con base a su coloración, la cual fue compatible con las células de la papila dérmica; considerando por lo tanto, que son células que derivan de la papila dérmica.
 - d) Las divisiones mitóticas del epitelio, se presentaron en mayor grado el día 13 de crecimiento, lo cual coincide con un aumento en la vascularización y en el número de fibroblastos en la pulpa.
 - e) Presencia de grasas neutras entre la papila dérmica y la pulpa.

X. PERSPECTIVAS

- 1) Realizar estudios ultraestructurales con microscopia electrónica, para determinar:
 - a) Si realmente las crestas de las barbas son pliegues o rearrreglos de las células epiteliales, considerando como un punto de referencia las uniones intercelulares.
 - b) Definir si se forman septos en el epitelio, los cuales induzcan la formación de las crestas, tratando de determinar si participa el tejido conectivo de la parte interna de la pluma, para la formación de los mismos, y analizar si participa la membrana basal.
 - c) Comparar ultraestructuralmente las células oscuras con las de la papila dérmica, para analizar si presentan características comunes y ayudar a confirmar su origen a partir de la misma papila.
 - d) Definir si realmente los espacios que se forman en el epitelio de las crestas, son por la pérdida de las células de apoyo o por la separación de las uniones intercelulares. Estudiando de manera secuencial las relaciones celulares.
- 2) Analizar la maduración del tejido interno del cálamo, ya que probablemente tenga una posible diferenciación a tejido adiposo y/o a un tejido conectivo de tipo laxo.
- 3) La pluma se presenta como un posible modelo para el estudio de células troncales en diferentes condiciones fisiológicas, para contribuir con información sobre los procesos de regeneración y estos a su vez se puedan aplicar en la ingeniería de tejidos.

XI. REFERENCIAS

- Alibardi, L. (2006). Cell structure of barb ridges in down feathers and juvenile wing feathers of the developing chick embryo: Barb ridge modification in relation to feather evolution. *Ann Anat*, 88, 303-318.
- Alibardi, L. (2007a). Cell organization of barb ridges in regenerating feathers of the quail: implications of the elongation of barb ridges for the evolution and diversification of feathers. *Acta Zoologica (Stockholm)*, 88, 101-117.
- Alibardi, L. (2007b). Cytological aspects of the differentiation of barb cells during the formation of the ramus of feathers. *Int J Morphol*, 25(1), 73-83.
- Alibardi, L. (2007c). Wedge cells during regeneration of juvenile and adult feathers and their role in carving out the branching pattern of barbs. *Ann Anat*, 189, 234-242.
- Alibardi, L. (2009). Cornification of the pulp epithelium and formation of pulp cups in downfeathers and regenerating feathers. *Anat Sci Int*, 85, 269-279.
- Alibardi, L. (2010). Ultrastructure of the feather follicle in relation to the formation of the rachis in pennaceous feathers. *Anat Sci Int* 85, 79-91.
- Alibardi, L. (2011). Cell junctions during morphogenesis of feathers: general ultrastructure with emphasis on adherens junctions. *Acta Zoologica (Stockholm)*, 92, 89-100.
- Banks, W. J. (1986). *Histología Veterinaria y Aplicada*. México: Manual Moderno. p 424,425.
- Bavdek, S., Golob Z, G., Van Dijk, J., Dorrestei, G. M., & Fazarinc, G. (1997). Vimentin and desmin-positive cells in the moulting budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) skin. *Anat Histol Embryol*, 26, 173-178.
- Bragulla, H. H., & Homberger, D. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat*, 214, 516-559.
- Bragulla, H., & Hirschberg, R. (2003). Horse hooves and bird feathers: Two model systems for studying the structure and development of highly adapted integumentary accessory organs the role of the dermo epidermal interface for the micro-architecture of complex epidermal structures. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)*, 298B, 140-151.

- Broggil, J., Gamero, A., Hohtola, E., Orell, M., & Nilson, J. A. (2011). Interpopulation variation in contour feather structure is environmentally determined in great tits. *Journal Anatomical Society of Great Britain and Ireland*, 6, 1-5.
- Cason, J. E. (1950). A rapid one-step Mallory- Heidenhai stain for connective tissue. *Stain technol*, 25(4), 225-226.
- Cediel, J. F., Cárdenas, M. H., García, A., Chuayre, J., Payan, C., & Sánchez, C. (2009). Manual de Histología: Tejidos fundamentales. Universidad de Rosario Colombia. p 35-41.
- Chang, C. H., Yu, M., Wu, P., Jiang, T. X., Yu, H. S., Widelitz, R. B., y otros. (2004). Sculpting skin appendages out of epidermal layers via temporally and spatially regulated apoptotic events. *J Invest Dermatol*, 122, 1348-1355.
- Chuong, C.M., Yeh, C. Y., & Jiang, T. X. Module-based complexity formation: periodic patterning in feathers and hairs. *Wires developmental biology*, 2(18), 462-465
- Dawson, A., Perrins, C. M., Sharp, P. J., Wheeler, D., & Groves, S. (2009). The involvement of prolactin in avian molt: the effects of gender and breeding success on the timing of molt in Mute swans (*Cygnus olor*). *General and Comparative Endocrinology*, 161(2), 267-270.
- Douailly, D. (2009). A new scenario for the evolutionary origin of hair, feather and avian scales. *J Anat*, 214, 587-606.
- Dyck, J. (1985). The evolution of feathers. *Zoologica Scripta*, 14(2), 137-154.
- Estrada, F. E., Zamora, P. L., & Manzano, R. P. (1982). *Manual de Técnicas Histológicas*.p 140
- Gade, N. E., Pratheesh, M. D., Nath, A., Dubey, P. K., Amarpal, G., & Sharma, T. (2012). Therapeutic potential of stem cell in veterinary practice. *Vet World*, 5(8), 499-507.
- Gallina, T. S., & López, G. C. (2011). Manual de técnicas para el estudio de la fauna. 16. (T. S. Gallina, & L. G. Carlos, Edits.) Instituto de Ecología A C, Universidad Autónoma de Querétaro, México.p 16
- Gienapp, P., & Merilä, J. P. (2010). Genetic and environmental effects on a condition-dependent trait: feather growth in Siberian jays. *J Evol Biol* , 23, 715-723.

- Godtblum, R. W., Piper, W. N., & Campbell, A. W. (1954). A comparison of three histochemical stains for the demonstration of protein-bound sulfhydryl groups in normal human skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 375-383.
- Harris, M. P., & Linkhart, B. L. (2004). Bmp7 mediates early signaling events during induction of chick epidermal organs. *Developmental dynamics*, 23, 22-32.
- Harris, M. P., Barbara, L. L., & Fallon, J. F. (2004). Bmp7 mediates early signaling events during induction of chick epidermal organs. *Developmental Dynamics*, 231, 22-32.
- Jeffery, P. T. (1987). Zoologia. Cordados. Reverte. p 981.
- Lillie, F. R. (1954). *Histopatologic Technic and Practical Histochemistry*. New York Toronto E.U: The blakiston company. p. 173, 176.
- Lillie, F. R., & Juhn, M. (1938). Physiology of development of the feather. II. General principles of development with special reference to the after-feather. *Physiological Zoology*, 11(4), 434-450.
- Lillie, F. R., & Wang, H. (1941). Physiology of development of the feather V. Experimental morphogenesis. *Physiological Zoology*, 14(2), 103-135.
- Lillie, F., & Wang, H. (1944). Physiology of development of the feather. VII. An experimental study of induction. *Physiological Zoology*, 17(1), 1-31.
- Lin, J., Luo, J., & Redies, C. (2004). Differential regional expression of multiple ADAMs during feather bud formation. *Developmental Dynamics*, 231, 741-749.
- Lin, C. M., Jiang, T. X., Widelitz, R. B., & Chuong, C. M. (2006). Molecular signaling in feather morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 18, 730-741
- Lin, S. J., Widelitz, R. B., Yue, Z., Li, A., & Wu, X. (2013). Feather regeneration as a model for organogenesis. *Development Growth & Differentiation*, 55, 139-148.
- Maderson, P., Hillenius, W. J., & Hiller, D. C. (2009). Toward a comprehensive model feather regeneration. *J of Morphology*, 270, 1166-1208.
- Manus, J. F., & Mowry, R. W. (1964). *Staining Methods Histology and Histochemical*. Japon: Hoeber international. p 234.
- Michon, F., Charveron, M., & Dhouailly, D. (2007). Dermal condensation formation in the chick embryo: Requirement for integrin engagement and subsequent stabilization by a possible Notch/integrin interaction. *Developmental Dynamics*, 236, 755-768.

- Montero, C. (1997). *Manual de Técnicas de Histoquímica Básica*. San Luis Potosi México: Universidad Potosina. p 56.
- Pass, D. A. (1995). Normal anatomy of the avian skin. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 4(4), 152-160.
- Pescador, H. D. (2012). *Ingeniería Tisular para el tratamiento de las lesiones osteocondrales*. España: Universidad de Salamanca y David Pescador. p 71.
- Prum, R. O., & Dyck, J. (2003). A hierarchical model of plumage: Morphology, development, and evolution. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)*, 298B, 73-90.
- Prum, R. O., & Williamson, S. (2001). Theory of the growth and evolution of feather shape. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)*, 291, 30-57.
- Ross, M. H., & Wojciech, P. (2007). *Texto y atlas color con biología celular y molecular*. Buenos aires Argentina: Médica Panamericana. p 3-7
- Sawyer, R. H., Rogers, L., Washington, L., C. Glenn, T. C., & Knapp, L. W. (2005). Evolutionary origin of the feather epidermis. *Developmental Dynamics*, 232, 256-267.
- Sawyer, R. H., Rogers, L., Washington, L., C. Glenn, T. C., & Knapp, L. W. (2005). Evolutionary origin of the feather epidermis. *Developmental Dynamics*, 232, 256-267.
- SEMARNAT. (2009). Plan de Manejo Tipo Palomas. Subsecretaría de gestión para la protección ambiental. Dirección general de vida silvestre. Rocha, G.O. E; Rodríguez, B. M; Martínez, L. A. (recopiladores). p 5-17.
- Shere, A. T., & Chuong, C. M. (1996). Sonic Hedgehog in feather morphogenesis: Induction of mesenchymal condensation and association with cell death. *Developmental Dynamics*, 207, 157-170.
- Song, H. K., & Sawyer, R. (1996). Dorsal dermis of the scaleless (sc/sc) embryo directs normal feather pattern formation until day 8 of development. *Developmental Dynamics*, 205, 82-91.
- Torralva, F. M., Espinosa, C. E., & García, G. M. (1992). *Manual de Prácticas de Cordados* (Vol. 29). Colección Blanca. p 210.
- Ulrich, W. (2010). *Histología*. Madrid España: Médica Panamericana. p 7.

- Van C S., & Van D. B. W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat.Histol.Embryol.* 31, 214-223
- Wang, H. (1943). The morphogenetic functions of the epidermal and dermal components of the papilla in feather regeneration. *Physiological Zoology* , 16(4), 325-350.
- Wideliz, R. B; Jiang, T. X., Noveen, A., Ting, B.S.A., Yin, E., Jung, H. S., & Chuong. C. M. (1997). Molecular histology in skin appendage morphogenesis. *Microscopy Reserch and Technique* 38, 452–465.
- Widelitz, R. B., Jiang, T., Yu, M., Shen, T., Shen, J. Y., Wu, P., y otros. (2003). Molecular biology of feather morphogenesis: A testable model for evo-devo research. *Journal of Experimental Zoology*, 298B, 109-122.
- Yap, K. K. (2012). Modelling human development and disease: The role of animals, stem cells, and future perspectives. *Australian Medical Student Journal* 3(2), 8-10.
- Yue, Z., Jiang, T. X., Widelitz, R. B., & Chuong, C. M. (2006). Wnt3a gradient converts radial to bilateral feather symmetry via topological arrangement of epithelia. *PNAS*, 103(4), 951-955.