

21  
2010

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



ALTERNATIVAS PARA EL SEXADO DE  
PSITACIDOS EN CAUTIVERIO:  
ESTUDIO RECAPITULATIVO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MARTIN DE J. GUTIERREZ GUERRERO

ASESORES: M.V.Z. FERNANDO GUAL SILL  
M.V.Z. RAFAEL TINAJERO AYALA  
M.V.Z. EVERARDO MONTFORT RAMIREZ



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1994



## **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 está 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.

Quiero expresar un especial agradecimiento a:

M.V.Z. Fernando Guai Sill	(ZOOLOGICO DE CHAPULTEPEC)
M.V.Z. Rafael Tinajero Ayala	(ZOOLOGICO DE CHAPULTEPEC)
M.V.Z. Everardo Montfort Ramírez	(ZOOLOGICO DE CHAPULTEPEC)
M.V.Z. José Pulido Reyes	(ZOOLOGICO DE CHAPULTEPEC)
Dra. Marta Romano	(C.I.N.V.E.S.T.A.V.)
D.V.M. Kim L. Joyner	(AVIARIOS MARIANA, FUNDACION QUATEMALA)
Ph.D. Jean M. Dubach	(CHICAGO BROOKFIELD ZOO ILLINOIS U.S.A)
D.V.M. Judith Veening	(WORLD PARROT TRUST UNITED KINGDOM)
D.V.M. Judy Arthur	(CAGE BIRD CLUB OF N-W TENNESSEE TENNESSEE U.S.A.)
D.V.M. Karen Kane	(ZOOGEN INC.)

Por compartir su tiempo y conocimientos.

ALTERNATIVAS PARA EL SEXADO  
DE PSITACIDOS EN CAUTIVERIO.



P.M.V.Z. MARTIN GUTIERREZ G.

## I N D I C E .

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PSITACIDOS .....	6
PSITACIDOS MAS COMUNES EN MEXICO .....	8
METODOS DE SUJECCION Y CONTENCIÓN DE LOS PSITACIDOS .....	11
ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA PLUMA .....	13
SEXADO QUIRÚRGICO	
OTOSCOPIA .....	14
ENDOSCOPIA .....	16
DIMORFISMO SEXUAL .....	19
IDENTIFICACION DE CROMOSOMAS SEXUALES .....	21
IDENTIFICACION DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE DNA .....	27
ANÁLISIS DE HORMONAS ESTEROIDES .....	31
LITERATURA CITADA .....	35
ANEXO DE FIGURAS .....	38

RESUMEN .



## RESUMEN.

Alternativas para el sexado de Psitácidos en cautiverio: estudio recapitulativo; realizado por PHVZ. Martín Gutiérrez Guerrero; bajo la asesoría de MVZ. Fernando Gual Sill, MVZ. Rafael Tinajero Ayala y de MVZ. Everado Montfort Ramírez.

Las técnicas que se pueden utilizar para el sexado de psitácidos en cautiverio son muy variadas; algunas son simples como el dimorfismo sexual mientras que otras como la identificación de cromosomas sexuales son más sofisticadas. Es importante contar con opciones flexibles y adaptables a las necesidades de la persona que desea realizar el sexado. Aunque las técnicas de otoscopia y endoscopia son las más utilizadas para el sexado de aves monomórficas, es necesario adaptar otras técnicas para tener un panorama tanto de las ventajas como de las desventajas que ofrecen. ANALISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA PLUMA; Ventajas: no es traumática, se puede realizar en animales muy jóvenes. Desventajas: se cuenta con muy poca información acerca de los parametros utilizados para determinar el sexo. OTOSCOPIA Y ENDOSCOPIA; Ventajas: en aves maduras sexualmente se obtiene un 97% de confiabilidad, se pueden observar otros órganos como riñón, hígado, sacos aéreos, pulmón, intestinos y bazo. Desventajas: cualquier tipo de anestesia implica riesgos, se debe tener cuidado durante la recuperación. DIMORFISMO SEXUAL; Ventajas: el estrés que se produce en el ave es mínimo, es 100% utilizable en campo. Desventajas: solamente el 30% de los psitácidos presenta dimorfismo sexual, es determinante la experiencia de la persona que lo realiza. IDENTIFICACION DE CROMOSOMAS SEXUALES; Ventajas: el trauma para el animal es mínimo ya que solamente se requiere de una muestra sanguínea o de pulpa de plumas en crecimiento, es altamente confiable, se pueden apreciar problemas genéticos. IDENTIFICACION DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE DNA; Ventajas: solo se requiere de una mínima cantidad de muestra sanguínea, se pueden apreciar problemas genéticos. Desventajas: se requiere de sondas específicas de cada especie que se desee sexar. ANALISIS DE HORMONAS ESTEROIDES; Ventajas: el trauma para el animal es mínimo, la confiabilidad es del 97%, Desventajas: se requiere de la ubicación exacta de cuales son las heces del animal que se desea sexar. Cabe señalar que existen casas comerciales en los Estados Unidos de Norteamérica, como ZOOGEN en las cuales se realiza en forma comercial la técnica de identificación de secuencias específicas de DNA, mientras que en el Chicago Brookfield Zoo de Illinois y el Zoológico de San Diego California se realizan las técnicas de identificación de cromosomas sexuales y la técnica de análisis de hormonas esteroideas respectivamente, aunque con fines experimentales. Es importante indicar que todas las técnicas descritas son aplicables no solo en psitácidos, sino en cualquier tipo de ave monomórfica, aunque en algunas especies se cuenta con más información que en otras.

INTRODUCCION .



## INTRODUCCION:

El mundo se encuentra dividido en 6 grandes regiones geográficas limitadas por barreras naturales que pueden ser marinas, terrestres o climáticas, en México convergen la Neártica y la Neotrópica, con una región intermedia llamada de transición, lo cual le confiere una riquísima diversidad faunística. (29)

Por desgracia, en los últimos años se ha visto incrementada, tanto en México como en otras partes del mundo, la demanda de animales silvestres para mantenerlos como animales en cautiverio o de compañía, la gente de algunos países adquiere la fauna propia de su región, mientras que otros como Francia, Inglaterra, Estados Unidos o Alemania los importan, alcanzando estos animales precios altos. (29,30,33)

Durante la década de los ochentas, muchos países de Sudamérica prohibieron la exportación de su fauna nativa apoyados por el "CITES", que es la convención que regula el tráfico de especies en peligro de extinción.

En México a partir de 1974 (antes de la entrada en vigor del "CITES") se estableció un control estricto en cada envío legal de aves, contabilizando los ejemplares exportados, lo cual permitió no solo reglamentar su comercio, sino también, conocer con precisión las especies y número de aves que se ven afectadas a lo largo de la temporada dando como resultado una importante derrama económica en el medio rural ya que cada año (antes de que México entrara al "CITES" en Septiembre de 1991) se exportaban alrededor de 12,163 individuos de solamente 6 especies de psitácidos, lo cual representa aproximadamente el 15.5% del total de exportaciones de aves silvestres. (29-30)

Tal vez las especies que mas demanda tienen por parte de la gente son las aves, especialmente las de la familia Psittacidae como son las Guacamayas, Cacatúas, Pericos y Loros, estos animales son buscados por diversas razones como son:

- El extraordinario colorido de su plumaje
- La docilidad de algunos individuos en su contacto con el hombre.
- Su habilidad para reproducir sonidos que pueden imitar voces o palabras (aunque esto es privativo de ciertas especies e individuos y solamente cuando hay contacto con el Hombre). (3)
- Su capacidad para aprender actos que realizan en espectáculos o simplemente como animales de compañía, ornato o exhibición.

Cualquiera que sea el motivo por el cual son buscadas estas aves y a los altos precios que alcanzan tanto en el mercado legal como en el ilegal las coloca en una situación difícil para su supervivencia ya que desde 1970 en México se han capturado estos animales en cantidades inaceptables.

Muchos individuos son apenas crias cuando son sacados de sus hábitats naturales y son alimentados por personas sin conocimientos de nutrición o higiene y sin conciencia del daño que se produce en los ecosistemas debido a que muchas de estas especies se encuentran en peligro de extinción, desgraciadamente mantener a estos animales como mascotas se considera una moda, aproximadamente el 95% de las aves son mantenidas en forma aislada de otros animales de su misma especie, por tal motivo se improntan de tal forma a sus propietarios que se les provoca un daño psicológico si no se les proporciona el cuidado y la atención adecuada, además puede disminuir su longevidad.

(30)

La extracción de animales de su hábitat natural da como resultado un alto índice de mortalidad que puede alcanzar hasta un 90% de las aves recolectadas debido al estrés que les produce la captura, el manejo y a que su adaptación al cautiverio es muy difícil.

Si a lo anterior añadimos que las aves del orden psitaciforme se reproducen lentamente dando en promedio una sola nidada anual (debido a que los pollos permanecen con los padres aproximadamente 1 año) (25) y en cada nidada tienen 2 huevos (el número de huevos esta determinado por la especie) y a la persistencia con que cada año se destruyen cientos de hectáreas de reservas ecológicas, podremos comprender el peligro de extinción en el que se encuentran.

La población de muchos animales en vida silvestre disminuye drásticamente; ante esta situación, además de promover el rescate y la conservación de hábitats naturales y de apoyar la propagación de animales en cautiverio, es necesario plantear la posibilidad de que la cría en cautiverio de psitácidos fuera la única posibilidad legal de obtener animales para fines comerciales. (26)

Para muchas especies en peligro de extinción esta pudiera ser la única posibilidad de supervivencia debido a que los animales son identificados desde su nacimiento y se estrecha el control del tráfico de los mismos, además de que si los animales son obtenidos de un criadero registrado se pueden conocer con exactitud aspectos como la edad de animal, posibles problemas congénitos y antecedentes clínicos del individuo, así mismo se puede evitar en forma significativa la consanguinidad.\*

\* comunicación personal Karen Kane (1000EN)

Conservación... Se puede definir como el modo de uso de nuestro entorno natural, es en el análisis final, la mayor forma de ecología natural, prevengamos el derroche mientras se preserva, mejora y renueva la calidad y utilidad de todos nuestros recursos"

John F. Kennedy.  
Mensaje al congreso 1962 (15)

Se dice que el periquito carolina (Conuropsis carolinensis) y posiblemente otras especies ya extintas se hubieran podido salvar mediante la reproducción en cautiverio, esto pudiera ser cierto, aunque el papel principal lo llevan las instituciones gubernamentales y los zoológicos que tienen la responsabilidad pública de la conservación de todas las especies. (15)

La vida silvestre es un recurso que se ha venido explotando, el número de especies desaparecidas o que es raro verlas en su estado natural, se ven incrementadas, por lo que se debe evitar que otras especies sigan el camino de la extinción de el periquito carolina.

Las grandes Guacamayas como la Escarlata (Ara macao), la Jacinta (Anodorhynchus hyacinthinus), la Azul Amarillo (Ara ararauna) y la Militar (Ara militaris) están consideradas en peligro de extinción por la excesiva pérdida de hábitats naturales y no es de ninguna forma ético el promoverlas como mascotas.

El mayor problema para implantar un programa reproductivo en psitácidos mantenidos en cautiverio, es colocar a dos individuos de diferente sexo, macho y hembra, en los albergues adecuados, esto es debido a que muchas de estas aves no presentan dimorfismo sexual, así el primer paso para lograr la reproducción en cautiverio es identificar cual es el macho y cual es la hembra. (2,12,26)

Otra razón importante de saber el sexo del individuo es debido a que pueden presentarse enfermedades propias de un determinado sexo, como la peritonitis de la yema o la impactación del oviducto y conocer el sexo puede ayudar a emitir un diagnóstico rápido.\*

Es importante recordar que existen factores extrínsecos, como una adecuada alimentación, medidas de higiene y un medio ambiente apropiado que se deben cuidar para obtener éxitos reproductivos.

\* comunicación personal Karen Kene (1980)

Existen diversos métodos para determinar el sexo de aves silvestres mantenidas en cautiverio, algunos se emplean en forma rutinaria mientras que otros requieren de una mayor difusión, algunos de estos métodos son:

- "Análisis de la estructura de las plumas"
- "Sexado quirúrgico" (otoscopia y endoscopia)
- "Dimorfismo sexual"
- "Identificación de cromosomas sexuales"
- "Identificación de secuencias específicas de DNA"
- "Análisis de hormonas esteroides"

Todas estas técnicas ofrecen tanto ventajas como desventajas y ninguna es aplicable ni en todos los individuos ni en todas las ocasiones, aunque la técnica mas apropiada para sexar aves silvestres es aquella que ofrece un mínimo de estrés y manejo, la que produzca el menor trauma posible y sea menos invasiva para el animal, la más rápida y económica y la que muestre un alto índice de confiabilidad en la determinación del sexo, ya que de no ser así, se compromete la integridad del individuo y se complica a los criadores el apareamiento de las aves.

El objetivo de la presente tesis, es dar a conocer al Médico Veterinario Zootecnista y a las personas interesadas en el tema, otras opciones o alternativas que se han desarrollado para determinar el sexo de las aves del orden psittaciforme, estas opciones han tenido poca difusión en México y evaluando a fondo sus ventajas y desventajas se podría elegir la forma más adecuada o conveniente para sexar a estos animales y de este modo aprovechar de una forma más racional el potencial que nos ofrecen.

CARACTERISTICAS GENERALES  
DE LOS PSITACIDOS.



## CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PSITACIDOS

Los miembros de la familia psitacidae se distribuyen geográficamente en forma natural en regiones de Centro y Srdamérica, áreas del Pacífico y Euro-Asiático-Africanas a través de regiones tropicales, las dimensiones que presentan pueden ir desde los 8 cm. Hasta 100 cm. de altura.(11-15)

Algunas de las características más representativas son:

- Tienen en la mandíbula superior un pico encorvado, el cual se articula con el cráneo y ocluye o cubre la mandíbula inferior.(11)
- La gran movilidad de ambas mandíbulas ayudan al animal a alimentarse, por ejemplo rompiendo cascara gruesas o ramas de árboles, también le ayuda a sujetarse a los lugares por donde trepa.
- Algunas tienen una gruesa y musculosa lengua la cual contiene una estructura osea llamada "Entoglósum", la lengua les ayuda en los movimientos necesarios para tomar sus alimentos.
- La pata de estas aves es "Zigodactilar", o sea que dos de los dedos, el segundo y el tercero están dispuestos hacia adelante, mientras que los dedos primero y cuarto se disponen hacia atrás, esta disposición en los dedos le permite formar un gancho que le ayuda a asirse a las ramas o a sujetar su comida.(11)
- La mayoría de los psitácidos tienen un polvo fino disperso debajo del plumaje, son las barbillas que se desintegran continuamente, ese polvo es usado por el ave para efectuar el aseo de sus plumas.
- Los psitácidos presentan en el ala 10 plumas remeras primarias de vuelo, la única excepción es el loro-búho, el cual tiene 9 plumas remeras primarias.
- Todos muestran 6 pares de plumas timoneras en la cola.

La edad a la cual alcanzan su madurez sexual es muy variable, por lo general sucede entre los 3 y 4 años de edad en las especies más grandes y entre 1 y 2 años en las especies más pequeñas.

Existe un registro de la Cacatúa Rey Australiana (Alisteru scapularis), las cuales se aparearon poseyendo aun el plumón previo a la aparición de las plumas maduras. (15,25)

Marshal y Serventy (1958), mostraron que el perico Australiano (Melopsittacus undulatus) puede producir espermatozoides dentro de los primeros 60 días despues de dejar el nido, este desarrollo sexual rápido es una adaptación fisiológica para reproducirse si las condiciones son las propicias. (15)

La mayoría de los psitácidos forman parejas estrechas , debido al hecho de que tienen depredadores naturales, se unen en parvadas ayudándose entre si y mostrando gran afecto por su pareja; al mantenerlos en cautiverio y cuando solamente se posee un ejemplar, transfieren ese afecto a la compañía humana.

PSITACIDOS MAS COMUNES EN MEXICO.



## PSITACIDOS MAS COMUNES EN MEXICO .

Como se mencionó con anterioridad, la riqueza faunística de México es enorme, por lo que aquí solamente se describirán en forma superficial las características morfológicas principales de los psitácidos más comunes en México y que pudieran ser sujetos de la práctica de las técnicas que se mencionan para la determinación del sexo en aves.

### Ara macao

Sinónimos: Guacamaya escarlata o Guacamaya roja.

Características: largo 85 cms., Color rojo intenso en todo el cuerpo, mejillas de color carne, hombros amarillos, mandíbula superior de color hueso con negro en la base, mandíbula inferior color negro grisáceo, patas de color gris oscuro.

Hábitat: selvas tropicales y sabanas, se encuentra en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Oaxaca, Campeche y Chiapas. (33)

### Ara militaris

Sinónimos: Guacamaya militar o Guacamaya verde.

Características: largo 65 cms., Color verde olivo, frente roja, rabadilla azul, plumas remeras de color rojo azulado, plumas primarias azules, mejillas marcadas por hileras de pequeñas plumas de color café violáceo, ojos amarillos, pico de color gris obscuro, patas de color gris claro .

Hábitat: lugares semiáridos, bosques secos y áreas abiertas, se encuentra en los estados de Sonora, del Istmo de Tehuantepec a Chihuahua, Zacatecas, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí y Colima. (33)

### Aratinga astec

Sinónimos: Periquito verde

Características: largo 24 cms., garganta y pecho de color verde olivo, plumas primarias azules, pico color hueso, anillo peri orbitálmico blanco, patas de color gris claro.

Hábitat: desde zonas semiáridas hasta selvas tropicales, principalmente en la región este de México, se encuentra en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Chiapas, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. (33)

Aratinga canicularis

Sinónimos: Perico atolero

Características: largo 24 cms., Cuerpo verde, frente anaranjada, corona azul verdosa, anillo perioftálmico de color amarillo, plumas primarias azules, ojos amarillos, pico de color hueso y comunmente pigmentado, patas de color gris.

Hábitat: bosques, zonas tropicales y semiáridas, se encuentra en los estados de la vertiente del Pacífico, de Sinaloa a Durango, Nayarit, Michoacán, Oaxaca, Chiapas y Guerrero. (33)

Aratinga holochlora

Sinónimos: Perico albiverde, Perico verde

Características: largo 33 cms., Color verde con algunas plumas amarillas, anillo perioftálmico blanco, pico color hueso, ojos anaranjados, cola larga.

Hábitat: bosques, zonas semiáridas abiertas, no se encuentra en zonas tropicales, se puede localizar en los estados de Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, Oaxaca, Chiapas y Quintana Roo. (33)

Amazona albifrons

Sinónimos: Perico de frente blanca o guayabero

Características: largo 27 cms., Plumas verdes perfiladas en negro, frente blanca, antifaz rojo, corona azul, plumas coberteras primarias y de la región del álula rojas, plumas primarias azules, ojos amarillos, pico amarillento, patas de color gris claro.

Hábitat: bosques bajos y zonas tropicales, se encuentra en los estados de Sonora a Chiapas y de Tamaulipas a Yucatán a lo largo de las costas del país. (33)

Amazona autumnalis

Sinónimos: Loro cariamarillo

Características: largo 35 cms., Plumaje verde perfilado en negro, frente roja, corona azul, mejillas amarillas, ojos amarillos, plumas primarias con algo de rojo, pico de color hueso y a veces pigmentado, patas de color gris.

Hábitat: áreas bajas del este y sureste, bosques húmedos, se encuentra en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Oaxaca, Campeche, Tabasco, Chiapas y Quintana Roo. (33)

Amazona ochrocephala

Sinónimos: Loro de cabeza amarilla

Características: largo 40 cms., Color verde con los hombros en rojo, cabeza amarilla, plumas primarias azules, ojos anaranjados, pico de color hueso, patas grises.

Hábitat: áreas húmedas y tropicales hasta bosques, se puede localizar en los estados de Colima, Nuevo León, Tamaulipas, Campeche, Oaxaca, Chiapas y Quintana Roo, a lo largo de las vertientes del Pacífico y del Golfo. (33)

Amazona finshii

Sinónimos: Loro de cabeza morada

Características: mide 32 cms., Tiene la frente lila y una corona de color azul, mejillas de color verde brillante, no presenta color rojo en la cola, ojos de color naranja, pico de color hueso, patas de color gris verdoso.

Hábitat: bosques y montañas hasta una altura de 2200 mts. snm. se puede encontrar en el estado de Sonora y desde Chihuahua a Oaxaca. (33)

Amazona viridigenalis

Sinónimo: Loro tamaulipéco, Perico amapola

Características: largo 33 cms., Plumas verdes perfiladas en negro, frente roja, coronilla azul, plumas coberteras rojas, plumas primarias azules o azuladas, cola color verde con la punta en amarillo, ojos amarillos, pico color hueso, patas color gris verdoso.

Hábitat: bosques de cipreses y acacias, áreas tropicales y lugares cercanos a ríos y lagos, se encuentra en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí y Veracruz. (33)

Rhynchopsitta pachyrhyncha

Sinónimos: Cotorra serrana occidental.

Características: largo 37.5 a 40 cm. es robusta, de cola larga y puntiaguda en forma de cuña, pico fuerte y negro, frente roja, color rojo en el ala la cual al volar muestra por debajo un color amarillo brillante.

Hábitat: montañas del Noroeste de México (Sierra Madre Occidental), hacia el Sur en la planicie central hasta Michoacán, habita en bosques de pino en tierras altas, se puede encontrar en los estados de Sonora, Nayarit y Jalisco. (33)

METODOS DE SUJECION Y CONTENCIÓN  
DE LOS PSITACIDOS.



## MÉTODOS DE SUJECION Y CONTENCIÓN DE LOS PSITACIDOS.

El lugar más apropiado para llevar a cabo la sujeción o contención de una ave con la característica de los psitácidos es el que tiene el menor mobiliario posible; ya que se restringen los sitios donde se puede esconder el ave en caso de que escapará, por lo tanto es menor la probabilidad de que se lastime, el techo no debe ser demasiado alto y de preferencia se debe contar con un control de intensidad de la luz artificial, lo ideal es efectuar el manejo con la menor intensidad de luz posible ya que un cuarto oscuro tiene efectos sedativos en aves diurnas, aunque en ocasiones y en especial las Guacamayas en estado silvestre pueden efectuar vuelos largos durante la noche.\*

### CONTENCIÓN FÍSICA:

Al sujetar al ave se debe tener cuidado de no rodear completamente el esternón del animal, ni de hacerlo con demasiada presión ya que se puede interferir con los movimientos de la respiración, si se utiliza una red, esta debe ser acorde al tamaño del ave y el tejido debe ser de un material suave para evitar traumas innecesarios.

Para sacar al ave de la red primero se toma la cabeza del individuo por detrás y sobre la red para controlar el pico, con la otra mano se controla el cuerpo y las patas, se debe tener cuidado con la gran movilidad de la cabeza y con la fuerza del pico, ya que con este el ave puede ser capaz de lastimar la mano o los dedos de la persona que la maneja.

### CONTENCIÓN QUÍMICA:

Su uso es muy controvertido en aves silvestres, se debe tener en mente que la inducción de un individuo hacia un plano de sedación o anestésico ofrece riesgos.

Se pueden utilizar anestésicos parenterales, dentro de estos se encuentran los más comúnmente utilizados, son una combinación de Ketamina-Xilacina (las dosis se describen con detalle en el capítulo de sexado quirúrgico), este tipo de anestesia parenteral se usa cuando no se cuenta con un equipo de anestesia inhalada o cuando se realizan maniobras en la región de la cabeza o el pico, al utilizar la Ketamina-Xilacina se obtiene buena relajación muscular y anestesia, se reduce la recuperación violenta, tiene un buen margen de seguridad y su costo es bajo en comparación con la anestesia inhalada, aunque también su recuperación es más lenta.

\* comunicación personal Elin L. Joyner (FUNDAVEZ GUATEMALA)

Aplicada a dosis altas puede provocar arrestos cardíacos, descenso de la temperatura, muertes súbitas y está contraindicada en aves con problemas hepáticos o renales.

También se pueden usar anestésicos inhalados que dan una inducción y recuperación bastante rápidas, además de que son sumamente seguros, aunque el costo del equipo de anestesia y del gas es elevado.

El gas anestésico más utilizado en aves es el Isoflurano seguido del Halothano, el gas es inducido con una sonda traqueal o con mascarilla, a una concentración de gas de 5%, con 2 a 3 lts. De oxígeno por minuto, dependiendo del tamaño del ave, una vez relajado el animal (aproximadamente de 1 a 4 minutos) el gas se baja y se mantiene en 2-3% con .5-1 l. De oxígeno por minuto, se debe tratar de mantener el gas lo más bajo posible para evitar riesgos. (32)

Los animales deben ser monitoreados durante la inducción, mantenimiento y recuperación de la anestesia, observando la profundidad y frecuencia respiratoria, el reflejo ocular, la frecuencia cardíaca y la temperatura.

#### EMERGENCIAS:

Un descenso en la frecuencia cardíaca, respiratoria o en la temperatura del animal pueden ser motivo de alerta, en caso de que la anestesia haya sido parenteral se pueden utilizar antagonistas y analépticos, se presiona con el dedo la quilla del esternón a razón de 40 ciclos por minuto y se coloca suero por vía endovenosa para acelerar el metabolismo del anestésico.

En caso de que la anestesia sea inhalada, se debe quitar la mascarilla o la sonda de la máquina de anestesia, se realiza resucitación pulmonar en caso necesario mediante presión con el dedo en la quilla del esternón a razón de 40 ciclos por minuto, se quita el gas residual de la máscara o sonda, se cierra el flujo de gas, se fluye oxígeno puro y se continúa con la resucitación hasta que el animal se encuentra en un rango seguro de 30 respiraciones por minuto, se usa terapia antishock y antiacidosis en caso necesario, por lo regular un arresto cardíaco es irreversible.

ANALISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA PLUMA .



#### ANALISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA PLUMA.

Este descubrimiento en el sexado de aves monomórficas es muy reciente, fue desarrollado por un estudiante de Veterinaria de la universidad de UTHA, Estados Unidos quien buscaba una forma sencilla de distinguir entre el macho y la hembra de especies monomórficas, comenzó buscando diferencias en muestras sanguíneas y por casualidad, parte de una pluma cayó en el portaobjetos que estaba preparando y cuando lo colocó al microscopio se hizo aparente la diferencia estructural de las plumas.

Se toma la muestra del ave y se separa una barba, la cual se coloca en una caja de petri para observarla al microscopio estereoscópico.

En los machos la estructura de las barbillas es menos tupida, mientras que en las hembras, las barbicelas o barbillas corren en ángulos rectos con referencia a la barba. (Fig.1)

La imagen se puede ver influenciada por:

- Maltrato de la muestra.
- Alteración de la estructura de la pluma si se utiliza una inclusión en parafina o de resina epóxica.
- Cantidad de queratina presente.
- Solo se puede observar en plumas maduras.

Trabajando con plumas tomadas del centro del ala derecha del ave se han obtenido buenos resultados en especies como Guacamayas y Faisánes, este descubrimiento podría revolucionar el sexado de aves monomórficas, podría ser posible sexar cualquier ave joven sin ninguna dificultad y solo se necesita tener acceso a cualquier microscopio o se podría enviar por correo una pluma a cualquier centro de examinación sin ningún riesgo para el ave.(2)

Desgraciadamente en nuestro país no se cuenta a la fecha con mayor información acerca de esta técnica, ni la presencia de casas comerciales que la desarrollen.

SEXADO QUIRURGICO  
OTOSCOPIA Y ENDOSCOPIA.



## SEXADO QUIRURGICO.

### OTOSCOPIA Y ENDOSCOPIA.

La Otoscopia y la Endoscopia son las técnicas más comunmente utilizadas para determinar el sexo en aves silvestres en cautiverio, la edad a la cual se recomienda su uso es entre los 11 y 12 meses, ambos métodos se basan en el examen visual de las gónadas y pueden dar un margen de certeza para la determinación del sexo de 90-97% (14,22,25,30,32)

En realidad la base del proceso quirúrgico de ambas técnicas es muy similar, aunque la técnica de Endoscopia posee dos diferencias fundamentales que radican en:

- 1 - El equipo que se utiliza.
- 2 - La técnica para abordar la cavidad abdominal.

Estos puntos se describen con detalle en el capítulo de Endoscopia.

#### OTOSCOPIA:

Esta técnica requiere de un equipo sencillo y económico, el ave a examinar se pesa, es recomendable dietarla 2 a 3 horas antes para que se vacíe el buche (11,14,22) o 12 horas antes para que se vacíen los intestinos, ya que su volumen puede interferir con la visibilidad (14), se le administra Cloruro de Ketamina a una dosis de 30-40 mg/k y Xilacina (ROMPUN) a una dosis de 0.5-1.5 mg/K. (14,22,25,32)

Debido a que la mayoría de las aves hembras tienen un solo ovario, el del lado izquierdo, ya que el ovario derecho se atrofia, el ave se coloca en decúbito lateral derecho para poder examinar el lado izquierdo; se mantiene al ave sobre un material aislante térmico y se sujeta mediante cordones, ligas o tela adhesiva, el ala izquierda se extiende en posición craneodorsal y el miembro posterior izquierdo se retrae caudalmente, se retiran las plumas de una pequeña área craneal a los músculos de la cadera y dicha área se prepara de acuerdo a los principios quirúrgicos. (2,11,14,17,22,35)

Se realiza una pequeña incisión de aproximadamente .5 cms. En la piel, esta incisión debe ser en dirección dorsoventral sobre el último espacio intercostal (fig.2).

En algunas especies se debe diseccionar el músculo sartorio y se le retrae en dirección caudal para dejar expuesto el último espacio intercostal (fig.3), Los músculos intercostales se inciden con una hoja de bisturí para entrar en el saco aéreo torácico posterior, la abertura se hace más grande mediante disección roma para permitir la introducción del espéculo del otoscópio previamente esterilizado en autoclave, se pueden usar espéculos de varios tamaños, dependiendo del tamaño del ave, se usan espéculos de 7-8 para aves de hasta 700 gr. y de 4-5 para aves de 300 gr. o menos.

Las costillas de las aves son sumamente flexibles y se distienden permitiendo el alojamiento de un instrumento grande (fig.4), Con excepción de aves muy pequeñas, las membranas que separan los sacos aéreos torácicos posteriores de los sacos aéreos abdominales anteriores interfieren con la visión de las gónadas que yacen dorsalmente.

La membrana del saco aéreo abdominal anterior puede punccionarse con un estilete de punta roma y se agranda mediante disección roma para permitir la introducción del espéculo del otoscópio (fig.5), En dirección dorsal a esa membrana se encuentran las gónadas, ya sea un ovario o un testículo, se pueden buscar en el polo craneal del riñón izquierdo, adyacente a la glándula adrenal y caudal al pulmón (fig.6). (2,11,14,17,22,25,35)

Después de identificar las gónadas, la incisión puede cerrarse con sutura absorbible, en ocasiones se puede dejar sin suturar si los músculos del muslo en su posición normal yacen entre la incisión de la piel y la intercostal, el enfisema subcutáneo ocasionado en el saco aéreo torácico posterior puede ser un efecto colateral de las heridas intercostales que se dejan sin suturar. (22)

La recuperación de la anestesia con el uso de Ketamina se lleva a cabo mejor si se coloca al ave en un medio ambiente tibio, por ejemplo entre los 27 y 32 grados c., En una área oscura y tranquila (11,14), algunas personas envuelven al ave holgadamente en un rollo de cartoncillo o en una toalla suave para evitar que se golpee durante la recuperación, además se debe evitar que el animal tenga por donde trepar ya que podría sufrir un traumatismo al caer. (2,14,35)

Si el proceso quirúrgico se realiza con cuidado y con la asepsia adecuada, el riesgo es mínimo y las complicaciones son nulas. (2,6,11,14,22,33,35)

## ENDOSCOPIA:

Como se mencionó con anterioridad, la Endoscopia varía de la Otoscopia en dos puntos principales, los cuales se describen a continuación.

- 1.- Variantes a la técnica de Otoscopia en cuanto al equipo que se utiliza: La combinación de un material óptico especial y los requerimientos de Endoscopia culminaron con el desarrollo de un instrumento llamado agujoscópio, el que se emplea rutinariamente en Endoscopia de aves de 2.2 mm de diámetro (cal.14); Sin embargo se pueden conseguir de 1.7 mm (cal.16) y de 4.0 mm (cal.10), Un sistema microscópico de aumentos de poder 30 agranda la imagen final, el sistema de lentes posee una guía interna de luz que proporciona la iluminación del área que se está observando, mientras que una guía de luz fibro-óptica flexible proporciona la luz al instrumento desde una fuente de luz de tungsteno.

La presencia de sacos aéreos hace del ave el paciente ideal para el uso de la Endoscopia ya que elimina la necesidad de insuflar el abdomen para poder observar las vísceras. (2,17,32,35)

- 2.- Variantes a la técnica de Otoscopia en cuanto a la forma de abordar la cavidad abdominal:

Una pequeña área de la región subiliaca se prepara en forma aséptica, las referencias para la localización del área óptima para la introducción de la cánula son: la última costilla, el ilion y la mitad proximal de la diáfisis del fémur (fig.7).

Se hace una incisión de puñal con mucho cuidado a través de la piel y de la fascia muscular, si ocurre un sangrado significativo en piel se debe controlar antes de insertar el endoscópio, ya que una gota de sangre puede obstruir la visión. Se penetra entre el músculo sartorio y el iliotibial, con frecuencia el músculo sartorio se perfora en las especies más musculadas sin que se observe claudicación subacuente.

La cánula y el trocar de punta aguda se dirigen perpendicularmente al eje medio del ave, o sea que el plano de la cánula debe ser paralelo a la columna vertebral del ave y se rota para entrar a peritoneo. Aunque es indispensable la perforación completa del peritoneo, se debe tener cuidado de no entrar con fuerza excesiva, se debe presionar solo hasta cuando se siente que el trocar ha perforado la pared peritoneal. (14,22).

Posteriormente la cánula con el trocar se dirigen hacia adelante y dorsalmente hacia el polo anterior del riñón, se retira el trocar y se inserta el agujoscópio en la cánula, si el instrumento está bien colocado, estará dentro del saco aéreo abdominal anterior.

#### COMPLICACIONES:

La más común es la obstrucción de la punta del endoscópio, el procedimiento debe hacerse lo más blanco posible, si se encontraran gotas de sangre la punta del instrumento debe tocar un órgano abdominal; si esto falla, se retira la punta y se limpia con una gasa estéril y alcohol para después reintroducirla. (22,35)

#### ASPECTO FISICO DE LAS GONADAS.

El testículo presenta una forma elíptica u oval, con vasos sanguíneos transversos y de superficie lisa, pueden estar parcial o totalmente pigmentados como en el caso de las Guacamayas, en las cuales es totalmente negro (14,35), su tamaño varía de acuerdo a la edad, la especie y el estado del ciclo reproductivo en el que se encuentra el ave, son pares y por posición, el izquierdo se ve fácilmente, aunque se requiere de manipulación para observar el testículo derecho a través del saco aéreo.

El ovario de una hembra adulta tiene una apariencia de racimo de uvas debido a los folículos prominentes y no hay problemas para su identificación (14,22), en hembras jóvenes no están presentes los folículos pero el ovario inmaduro es triangular y plano, tiene una superficie arenosa fina y carece de vascularización superficial evidente; si el Médico puede observar una gónada contralateral a través de la membrana del saco aéreo abdominal podría confirmarse que se trata de un macho ya que son muy pocas las especies de aves las que poseen ovarios pareados.

Para la localización exacta de las gónadas, se pueden tomar como referencia los riñones que se ven de color café oscuro, las glándulas adrenales que presentan un color anaranjado suave y los pulmones que son de color rosado. (2,14,22,35)

#### **OBSERVACIONES:**

*Como en cualquier técnica quirúrgica, los riesgos no están ausentes, ya que el animal puede tener problemas subclínicos que se potencializan con el uso de la anestesia y por el estrés del manejo, la mayoría de los autores opinan que es más seguro anestesiarse al paciente y con mayor razón si la técnica se comienza a aprender o si se aplica en aves con diferencias anatómicas significativas (22), la anestesia elimina el estrés y el movimiento del animal, así se evita la introducción excesiva del instrumento y se previenen contusiones o laceraciones de órganos intra-abdominales.(22)*

*La ventaja más significativa con el uso de estas técnicas radica en que el resultado se obtiene de inmediato, es rápida de realizar, el equipo que se requiere no es mucho más del que se usa en la clínica de pequeñas especies, es factible de realizar en aves jóvenes y además de identificar las gónadas se puede apreciar la actividad sexual del animal. Además se pueden inspeccionar otros órganos intra-abdominales como son el hígado, bazo, intestinos, riñones y sacos aéreos, aunque el trauma, el estrés y las complicaciones postquirúrgicas pueden reflejarse en una mortalidad de aproximadamente el 10% de las aves examinadas.(35)*

DIMORFISMO SEXUAL.



#### DIMORFISMO SEXUAL.

El fenómeno de dimorfismo sexual es la forma más sencilla para determinar el sexo en aves silvestres, se basa en la apreciación de diferencias de plumaje, coloración y dimensiones físicas entre los sexos, este método no es invasivo ni traumático y el manejo del animal puede ser mínimo o nulo, aunque una desventaja importante radica en el hecho de que en Psitácidos, el dimorfismo sexual solamente se presenta en aproximadamente el 30% de las especies. (17-30)

#### DIMORFISMO SEXUAL EN BASE A DIFERENCIAS DE PLUMAJE:

En algunas especies, las hembras tienen más cortas las plumas timoneras centrales, incluyendo algunos Loros cuya cola tiene forma de raqueta (15). En caso de aves en cautiverio este parámetro se puede ver alterado por el daño causado a las plumas o por la automutilación.

#### DIMORFISMO SEXUAL EN BASE A DIFERENCIAS DE COLORIDO DEL PLUMAJE:

Las diferencias en el color entre el macho y la hembra son sumamente evidentes en Psitácidos de Australia y Asia y menos evidentes en aves de África y América.

En la Amazona albifrons las plumas de la región del álula que en el macho son rojas, en las hembras son de color verde. (15)

Normalmente el macho posee los colores más brillantes y las hembras presentan colores más pálidos, aunque hay dos excepciones notables:

- 1.- En los Loros eclectus (Eclectus roratus) el color es tan diferente que por mucho tiempo se los consideraban especies diferentes, el macho es verde, con rojo debajo de las plumas cobertoras de las alas mientras que la hembra es de un rojo intenso y en ocasiones con azul debajo de las alas. (15)
- 2.- La hembra del loro ruppell's (Poicephalus ruppelli) es mucho más colorida que el macho. (15)

El color de las plumas se ve influenciado en aves en cautiverio por factores tales como el tipo de alimentación, el microclima y el fotoperiodo, se pueden confundir, por ejemplo, machos jóvenes que aun no alcanzan la coloración del plumaje adulto con hembras.

#### DIMORFISMO SEXUAL EN BASE A LAS DIFERENCIAS FISICAS.

En la mayoría de las aves el tamaño del macho es mayor al de la hembra, esto se explica por la presencia de testosterona en aves adultas y maduras, en el caso de los Psitácidos ocurre lo mismo, por ejemplo, en el Ara macao y en el Ara militaris, la hembra es ligeramente más pequeña que el macho, además de que su pico presenta una curvatura más tenue.

Esto no es determinante para diferenciar entre machos y hembras ya que si no se conoce la edad exacta del animal se puede confundir un macho joven con una hembra, lo mismo sucede si no existe un punto de comparación entre ambos sexos. (15)

En la mayoría de los Pericos Australianos, el macho presenta la cera de la nariz de color azul mientras que las hembras la presentan de color café. (3)

En el caso de las Cacatúas existe otra característica independiente de las anteriores y que también puede ayudar a la determinación del sexo, se trata del color del iris de los ojos, en las hembras el iris es de color café-rojizo mientras que en los machos el iris es de color café-negro. (30)

Como se mencionó al principio, es determinante la experiencia de la persona que realiza la observación.

IDENTIFICACION DE CROMOSOMAS SEXUALES.



## IDENTIFICACION DE CROMOSOMAS SEXUALES.

Las células animales contienen en sus núcleos las bases de la herencia (génes), durante la mitósis, estas estructuras nucleares se consolidan en una arreglo lineal y se hacen visibles al microscopio como cuerpos pareados llamados "cromosomas", cada especie tiene un numero característico de cromosomas con un par sencillo de cromosomas sexuales. (2,6,20)

Los cromosomas sexuales de las aves pueden ser observados y clasificados por el metodo "WZ", el cual consiste en la identificación de los cromosomas sexuales por su apariencia física.

En la identificación física microscópica, el cromosoma "Z" es más largo que el "W", y debido a que los cromosomas sexuales difieren enormemente, la examinación visual ayuda a determinar el sexo del ave. (Fig. 8 y 9)

El único requisito para realizar esta identificación es la obtención de una muestra sanguínea o de tejido de la pulpa de las plumas en crecimiento, ya que es en estos tejidos de crecimiento rápido donde los cromosomas sexuales se identifican más facilmente (25,34) así, las aves machos se identifican por la observación de un par de cromosomas "Z", mientras que las hembras presentan un par mixto, o sea, los cromosomas "Z" y "W". (2,6,13,17,20,21,25,32,34)

La técnica de identificación de cromosomas además nos da la ventaja de apreciar defectos cromosómicos como pueden ser:

**Inversiones:** es cuando un segmento del cromosoma es recorrido y rotado 180 grados colocándose en la parte posterior del cromosoma, lo cual repercute en una pobre fertilidad. (34)

**Traslocaciones:** es cuando dos segmentos de dos cromosomas diferentes son intercambiados entre si reduciendo en un 50% la fertilidad. (34)

**Triploidismo:** es cuando el embrión recibe 2 copias de los cromosomas maternos y 1 copia de los cromosomas paternos resultando 3 copias de cada cromosoma, estos animales son estériles. (34)

Esta técnica se puede aplicar en aves de cualquier edad y condición física, aunque el ave sufre estrés al ser manejada y se requiere personal técnico experimentado.

#### CULTIVO DE SANGRE AVICOLA.

Las células rojas sanguíneas de las aves son nucleadas y pueden interferir con la obtención de metafases de buena calidad, en este tipo de cultivo se procura eliminar la mayoría de estas células \* (25-34)

1. Se obtienen de 3 a 5 ml. De sangre y se colocan en tubos de vidrio con heparina sódica (no se deben usar tubos de plástico o que contengan EDTA ya que este tiene la propiedad de quelar los minerales y pudieran verse alteradas las pruebas). \*
2. En medio estéril se añaden 20 ul de PHA-H (ver cuadro 1) por cada ml. de sangre, se mezcla volteando el tubo y se refrigera por 30 min (si se rota el tubo se pueden apreciar grumos de células rojas).\*
3. En el frasco de cultivo, por cada ml. de sangre se añaden 50 ml de RPMI (ver cuadro 1) , 50 ul de POKEWEED MITOGEN y 50 ul de PHA-P. (Ver cuadro 1)
4. Se centrifuga por 5 min. a 30 rpm por cada gramo de muestra.
5. Se saca el sobrenadante conteniendo los linfocitos y se coloca en el frasco de cultivo.
6. Se incuba por 3 días a 38-40 grados centígrados y se procede a la cosecha del cultivo.

#### METODO DE COSECHADO \* (25-34)

##### Soluciones necesarias:

- A) Hipotónico: se debe hacer diariamente , 0.075 MKCl 2gr./dh2o, calentar a 37 grados c.
- B) Fijador: Metanol 3:1 ácido acético, prepararlo antes de usarlo y mantenerlo en hielo.

##### Proceso:

1. A cada 10 ml. De cultivo, añadir 30 ul (2 gotas ) de DEMICOLCINE (ver cuadro 1)
2. Incubar por 1 hora a temperatura ambiente (o por 4-5 horas si la especie no produce muchas mitosis).\*

\* Comunicación personal Jean Dubach (Chicago Brookfield Zoo)

3. Colocar el cultivo en un tubo de centrifuga de 15 ml. y añadir 1 ml. de hipotónico.
4. Centrifugar por 8 min. A 2700 rpm., Sacar el sobrenadante y resuspender.
5. Añadir 8-10 ml. De hipotónico, incubar por 12-14 min., remezclar y centrifugar por 8 min. A 2700 rpm, sacar el sobrenadante y resuspender.
6. Añadir lentamente y con movimiento constante 1 ml. de fijador, posteriormente se añaden otros 3 ml de fijador y por último se añade fijador cbp. 10-12 ml., Refrigerar por 30 min. o de preferencia toda la noche.
7. Centrifugar por 8 min. a 2700 rpm., Sacar el sobrenadante y resuspender.
8. Añadir 8-10 ml. De fijador, centrifugar por 8 min. a 2700 rpm.,sacar el sobrenadante y resuspender, repetir este paso hasta que el sobrenadante esté claro (mínimo 3 veces).
9. Añadir aproximadamente 1 ml. de fijador hasta tener una suspensión ligeramente turbia .
10. Colocar la suspensión en un portaobjetos y observarlo al microscopio de contraste de fases. (Fig. 10)

#### CULTIVO DE TEJIDO DE LA PULPA DE LA PLUMA EN CRECIMIENTO \*(25)

Todas las plumas de los pollos están en constante crecimiento, el tiempo ideal para obtener la pluma es cuando estas son de alfiler o cuando las muda.

En caso de que se trate de una ave adulta, es necesario quitar una pluma madura del ala o de la cola y esperar de 2 a 3 semanas (en ocasiones más, según la especie) para que el ave las reemplace y poder utilizarlas.(13,25,34) La pluma se toma con fórceps a lo largo del ástil, lo más cercano posible de la piel y jalando con firmeza, si la punta redonda de la pluma no se extrae, puede presentarse un sangrado importante, se pueden usar 1 o 2 plumas primarias timoneras o bien 10 o más plumas pequeñas.

1. Se colocan las plumas en una caja de pétri estéril para transportarlas al laboratorio, si se requieren más de 2 o 3 horas para su traslado al laboratorio se deben refrigerar, pero no congelar, si se deben guardar toda la noche, se corta la parte madura de la pluma y se deja solamente el ástil;

\* Comunicación personal Jean Dubach (Chicago Brookfield 100)

Se limpia con alcohol y se pone en un tubo estéril conteniendo medio de cultivo de tejido o en suero salino isotónico con penicilina (100 ui/ml.) o estreptomycin (100 mcg/ml.), micostatin (50-100 mcg/ml) o anfotericina b (25 mg/ml). (13)

2. Se añade a cada cultivo 2 ml. de medio de cultivo estéril sin suero con 1 mg/ml de Colagenasa
3. Se limpia la punta del ástil con alcohol al 70%, se corta el exceso de la pluma y se pone el ástil en una caja de pétri estéril conteniendo HBSS con ph 7.4 Y con 30 ul de antibiótico.
4. Con unas tijeras y hoja de bisturí estériles se corta a lo largo del ástil a cada lado para abrirlo, la pulpa es un material gelatinoso y claro rodeado por fibras negras, con la hoja de bisturí se raspa la pulpa y se pone en la solución.
5. Se pone la pulpa en una caja de pétri estéril conteniendo 2 ml. de medio sin suero y con colagenasa, se corta finamente con la hoja de bisturí y se agita suavemente a temperatura ambiente durante 20 min.
6. El efecto de la colagenasa se detiene si se añade 1 m de medio que contenga suero de becerro fetal o suero de pollo.
7. Se pasa la solución a un tubo de centrifuga estéril y se centrifuga por 10 min. A 1000 rpm.
8. Se saca el sobrenadante y se resuspende el paquete celular en 0.5 ml. de medio.
9. Se pasa la suspensión a frascos de cultivo de tejido y se añaden gotas de medio lo suficiente para cubrir las células, no para inundarlas.
10. Si el color del medio cambia, se puede cambiar el medio.

#### Cosechado:

Las soluciones necesarias son las mismas que se describen para el cosechado de cultivo sanguíneo.

#### Proceso:

- 1.- Añadir 0.4 ml. de DEMICOLCINE (ver cuadro 1)) a cada frasco e incubar por 4 horas a temperatura ambiente.

- 2.- Colocar el cultivo en un tubo de centrifuga y centrifugar por 8 min. a 2700 rpm.
- 3.- Sacar el sobrenadante y añadir 0.5 ml. de 0.75 KCl a cada tubo y ponerlos en baño Maria a 37 grados c.
- 4.- Poner 2.5 ml. De 0.75 kcl en los cultivos e incubar por 30 min.
- 5.- Mezclar los frascos, remover el fluido del cultivo y pasarlos a los tubos de centrifuga, centrifugar por 8 min. a 2700 rpm.
- 6.- Sacar el sobrenadante, añadir lentamente 1 ml. de fijador, después añadir 3 ml. de fijador y refrigerar por lo menos durante 30 min.
- 7.- Observar al microscopio de contraste de fáses. (FIG.11)

**Tinción:**

**Giemsa:** como se obtiene de la botella o filtrado mediante papel filtro de #1.

**Wright:** se mezclan 200 mg/120 ml. de Etanol, se deja reposar por 2 dias y despues se filtra a través de papel filtro del #1

**Preparación de los portaobjetos \***

- 1.- Limpiar los portaobjetos con Sparkleen, enjuagar 20 veces con agua del grifo y despues enjuagar 2 a 3 veces con agua destilada libre de iones.
- 2.- Usando guantes, se colocan los portaobjetos en los casilleros, formando un angulo de tal forma que no permita que 2 portaobjetos se llegen a tocar a lo largo (fig.12)
- 3.- Se cubren los portaobjetos con etanol al 70% (30% de agua destilada libre de iones), se tapa y se deja remojando 1 hora como mínimo.
- 4.- Se quita el etanol usando guantes para mantener los portaobjetos en su posición y se enjuagan las cajas mínimo 10 veces con agua destilada sin iones.
- 5.- Se llenan las cajas con agua destilada libre de iones hasta cubrir los portaobjetos y se mantienen en refrigeración.

\* Comunicación personal Jean Dubach (Chicago Brookfield 300)

CUADRO 1 MATERIALES PARA EL CULTIVO. \*

MEDIOS:

RPPI 1640, SIGMA, cat. #R7880, 100 ml., Estéril para incubación en Co<sub>2</sub>.  
AIM-V SERUM FREE MEDIA GIBCO, cat. #320-2055Ag, 100 ml. Estéril para incubación en Co<sub>2</sub>.  
HAM'S F-10. SIGMA, cat. #N6013, 100 ml. Estéril para incubación en Co<sub>2</sub>.  
RPPI 1640, HEPES MODIFICATION, SIGMA, cat. #R5632, 100 ml. Para cultivo cerrado sin Co<sub>2</sub>.

MITOGENOS:

PHA-P, PHITHEM AGGLUTININ, P-FORM, SIGMA, cat. #L9132  
PHA-M, PHITHEM AGGLUTININ, M-FORM, GIBCO, cat. #670-0576Ac (para cultivo de sangre aviar.  
POKEWEED, PHYTOLACA AMERICANA, SIGMA, cat. L9379.  
COLAGENASA, GIBCO, cat. #840-7018Ig

ANTIBIOTICOS:

antibiotico-antimicótico, SOLUCION HYBRIMAX, SIGMA, cat. #A4666 contiene: 10,000 ui penicilina g/ml.  
10Mg. Estreptomina/ml.  
25Mg. Anfotericina b/ml. En 0.9% NaCl .

MATERIALES PARA EL COSECHADO:

DEMICOLCINE, SIGMA, cat. #D-62-79, 1mg en 20 ml. (Concentración)  
KCl, POTASSIUM CHLORIDE, SIGMA, cat. #P-4504  
METHANO; , 99.99% Pure, FISHER SCIENTIFIC cat. #A936-1  
ACIDO ACETICO GLACIAL, HPLC GRADE, FISHER SCIENTIFIC cat. #A35-500

\* Comunicación personal Jean Dubach (Chicago Brookfield Zoo)

IDENTIFICACION DE SECUENCIAS  
ESPECIFICAS DE DNA.



#### IDENTIFICACION DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE DNA

Este método se basa en el reconocimiento de la ubicación exacta de las bases nitrogenadas o secuencias específicas de DNA que determinan la presencia de los cromosomas sexuales, se realiza con una muestra sanguínea, ya que la sangre es un tejido sumamente conveniente para muestrear y transportar. Su conveniencia radica en su alto peso molecular de DNA que mantiene sus características hasta por 1 semana almacenándolo a temperatura ambiente. (16,20,36)

El DNA se encuentra dentro del núcleo de las células, su azúcar es la desoxiribosa y tiene bases nitrogenadas pirimidicas (citosina y timina) y bases nitrogenadas púricas (adenina y guanina). (16,20,36)

Para tomar la muestra primero se debe sujetar al ave procurando evitar un trauma excesivo para el animal, posteriormente se efectúa un pequeño corte en la uña recolectando aproximadamente .2 ml. de sangre en un tubo capilar que contiene un conservador como la heparina.

Posteriormente las células sanguíneas se rompen para obtener el DNA que será purificado.

#### PROCEDIMIENTO PARA OBTENER DNA DE MUESTRAS SANGUINEAS. (16,27)

- 1.- Centrifugar la muestra a 5000 rpm., a 4 grados c. y durante 15 min.
- 2.- Aspirar la fracción del plasma
- 3.- Extraer el residuo de plasma mediante 3 lavados de la pastilla celular con NaCl al 0.9% a 4 grados c.
- 4.- Adicionar a la pastilla NaCl hasta completar 10 ml.
- 5.- Mezclar con 40 ml. de bufer lítico (1% tritón x-100 en 0.32M de sacarosa, 1 mM tris, ph 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) a una temperatura de 4 grados c., Centrifugando la muestra a 2500 rpm durante 15 min.
- 6.- Resuspender la pastilla con una pipeta pasteur en 25 ml. de bufer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, ph 8.0), Adicionar 1.25 ml. de SDS al 200% y 10 microgramos/ml. De vitamina K.
- 7.- Incubar durante toda la noche a 37 grados c.

- 8.- Extraer 2 veces con un volúmen de agua con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1), colectar el sobrenadante, centrifugar la fase acuosa a 7000 rpm durante 15 min.
- 9.- Extraer dos veces con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), centrifugar y colectar la fase acuosa sobrenadante.
- 10.- Adicionar y mezclar con 1/10 vol. De 3m de Na (CH<sub>3</sub> COO) y 2.5 vol. de Etanol al 100%.
- 11.- Incubar durante 12 horas a 20 grados c.
- 12.- Colectar el DNA por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 min. a 4 grados c.
- 13.- Lavar 3 veces con Etanol frío al 70% (-20 grados c.)
- 14.- Secar la pastilla al vacío (liofolizar)
- 15.- Resuspender la pastilla con el DNA en solución bufer tris-EDTA (10 mm tris-HCl, ph7.5, 1mm de EDTA ph8.0)

\* La producción de DNA varía de 40 a 50 ng por ml. de sangre

Una vez que se encuentra purificado el DNA, se corta por medio de enzimas de restricción, estas enzimas de restricción cortan las cadenas de DNA en sitios específicos, o sea que actúan como pequeñas tijeras moleculares.

Cada enzima de restricción tiene condiciones óptimas y sitios de reacción, los cuales son proporcionados por los fabricantes.

Una vez efectuado el corte quedan fragmentos de varios largos, los que son colocados sobre una cama o base de gel, donde se les aplica una corriente eléctrica, esta electroforésis nos permite separar, identificar y purificar fragmentos específicos de DNA, el cual siempre migra hacia el polo positivo y su velocidad de migración depende de varios factores como son:

El tamaño molecular - los fragmentos más pequeños migran con más rapidéz que los fragmentos largos.

Concentración de agarosaa mayor concentración hay menor migración conformación de DNA- el DNA circular y el lineal del mismo peso molecular migran a diferente velocidad

**La corriente aplicada y La temperatura**

**El DNA se identifica tiñiendo el gel con bromuro de Etidio , el cual se intercala entre las bases del DNA y flourece con la luz ultravioleta .(Fig. 13)**

\* Comunicación personal Jean Dubach (Chicago Brookfield Zoo)

## **TRANSFERENCIA TIPO "SOUTHERN" O TRANSFERENCIA A FILTROS DE NITROCELULOSA:**

El DNA que fue separado en el gel de agarosa se transfiere a filtros de nitrocelulosa, estos filtros se incuban en presencia de una solución de DNA como detector radioactivo el cual produce hibridación solamente con una secuencia homóloga en el filtro (esa secuencia es la sonda específica de la especie del ave que se desea sexar) (16,27).

### **Hibridación:**

Se basa en la propiedad que tiene la molécula de DNA de separar sus cadenas por la acción del calor o de la formamida y de aparearse en condiciones apropiadas con otra cadena, siempre y cuando ambas cadenas sean complementarias (sondas específicas de especie) (16,27)

### **Impresión y Análisis:**

En un cuarto oscuro la hoja de nylon o nitrocelulosa conteniendo la prueba radioactiva se coloca sobre un contenedor con película para rayos X, bandas oscuras se desarrollan en sitios específicos de la prueba y el resultado final es una impresión del DNA del ave.

La característica que se detectó en los primeros estudios de esta técnica y que sirvieron de aliciente para su desarrollo, fue que en todos los casos de muestras de hembras se presentó una débil línea en la banda 2.1 Kb, se ha concluido que esta banda representa un fragmento del cromosoma "W" (específico de hembras), esta banda estaba ausente en todas las muestras de machos, por lo tanto se utilizó su presencia para identificar hembras y su ausencia para identificar machos. (Fig.14) (28) \*

Esta técnica es altamente confiable, el estrés que se provoca al animal al tomar la muestra no es de ninguna forma significativo, se puede emplear en aves de cualquier edad y condición física aunque es caro y requiere de equipo especial y de técnicos calificados. \*

Existen actualmente casas comerciales en los Estados Unidos de Norteamérica como "ZOOGEN" quienes realizan esta técnica como servicio al público, su facilidad para realizarla radica en la información acumulada a lo largo de 20 años de investigación donde han obtenido un almacén importante de sondas específicas de al menos 200 especies de aves silvestres (20), aclaremos que para realizar esta técnica es indispensable poseer la sonda específica de especie, ya que esta incluye la secuencia de bases marcadas con tritio de los cromosomas sexuales que se desea hibridar. (Figs. 15 y 16)

\* Comunicación personal Faren Kane (ZOOGEN)

ANALISIS DE HORMONAS ESTEROIDES.



## ANÁLISIS DE HORMONAS ESTEROIDES.

El método de análisis de hormonas esteroides en heces fue desarrollado en el zoológico de San Diego California como una nueva alternativa para el sexado de aves que no presentan dimorfismo sexual y en la actualidad se encuentra bien establecida para una gran cantidad de aves monomórficas. (5,6,9,17,26,31)

La idea original se llevó a cabo por primera vez tomando muestras de la acumulación de uratos en el alantoides de los desechos de huevos eclosionados de Cóndor de California (*Gymngyps californianus*) y de Cóndor de los Andes (*Vultur gryphus*) encontrando que las gónadas, en una incubación normal, producen esteroides sexuales y que los ovarios embrionarios producen más estrógenos que el tejido testicular. (5,7,9,10)

Ambos tipos de hormonas, tanto estrógenos como testosterona son producidos por las gónadas de ambos sexos, aunque en diferentes proporciones. La testosterona es el andrógeno más importante, el 95% se produce en el testículo y el 5% en la glándula adrenal, los estrógenos se producen en el folículo ovárico de Graaf y el estríol es el metabolito más abundante en la excreción.

Ambos, al llegar al hígado son degradados y conjugados con glucorónidos y sulfatos, lo cual los hace ser más solubles en agua, posteriormente pasan por el riñón hasta llegar a la cloaca donde son excretados en forma de mezcla con la materia fecal. (5,6,10,18,19,23,26)

La técnica de análisis de hormonas esteroides no es invasiva ni traumática y se basa en un radioinmunoensayo (RIA), el cual es altamente sensible y es usado para medir los niveles de hormonas sexuales excretadas por las aves.

el RIA se puede complementar con una técnica de cromatografía por medio de columnas de "CELITE", lo cual nos indica el tipo de hormona que se detecta como son los estrógenos inmunoreactivos totales (E) y la testosterona inmunoreactiva total (T) en la muestra. (1,5,7,8,9,10,18,24,26,31,37)

El RIA se basa en la capacidad de la proteína de unirse específicamente a la molécula que reconoce (Ac) y se puede describir en forma general en dos etapas.

### **Primera etapa:**

La muestra de concentración desconocida se mezcla con un anticuerpo (Ac) específico contra la hormona que se desea cuantificar, además se añade una cantidad conocida de hormona pura marcada con tritio (de la misma hormona que se desea cuantificar), el Ac fija moléculas con o sin marcar según sus concentraciones relativas, si al Ac se le fijan muchas moléculas marcadas, indica que las moléculas no marcadas presentan poca competencia para formar complejos Ag-Ac, si por el contrario, se presentan pocas moléculas marcadas, indica que la concentración de moléculas no marcadas es alta, en base a estos datos se elabora una curva de calibración.

### **Segunda etapa:**

Se separa el complejo Ag-Ac de las moléculas marcadas que no reaccionaron con el Ag, después se cuantifica la radioactividad en el complejo y se usa la curva de calibración.(4)

### **Desarrollo:**

La recolección de muestras se realiza cada 4 horas durante 24 horas para poder establecer la cantidad de hormonas excretadas en este lapso de tiempo.(9,32)

Se aísla al ave en una jaula o caja pequeña colocando papel encerado en el piso, se debe evitar que el ave tenga acceso a este papel, si el ave se encuentra en una jaula de vuelo se le debe observar para recolectar la muestra lo mas rápido posible, las mejores muestras para esta prueba son las que se recolectan por la mañana, se debe incluir la mayor muestra líquida posible ya que la porción blanca de uratos es la que contiene los productos de deshecho renales necesarios para el análisis hormonal, las muestras se deben congelar inmediatamente y solo se descongelan hasta el momento de realizar la prueba.(8,9,10,31,32)

Las muestras se identifican y se ponen en envases de vidrio que previamente han sido lavados con jabón neutro y enjuagados con agua bidestilada, posteriormente se enfrían a -4/-10 grados centígrados o se congelan a 0/-15 grados centígrados con el fin de retardar la degradación bacteriana de los esteroides, de esta forma se pueden conservar hasta por 30 días.

Posteriormente se solubilizan en 5 volúmenes (en base al volúmen de la muestra) de 0.1M de bufer salino fosfatado (PBS), ph 7.2 Con 0.1% de gelatina para evitar que los esteroides se adhieran al vidrio y 0.1% de ácido sódico para retardar el crecimiento bacteriano, se agita con fuerza y se incuba por 24 horas a -4/-15 grados centígrados, se centrifuga a 2000 rpm y se decanta el sobrenadante.

1.0 ml de sobrenadante se ajusta a pH 5.2 Con ácido acético, se incuba por 24 horas a 37 grados c. Con 1000u fishman de beta glucoronidasa y 500u de sulfatasa, después se le añaden 2 gotas de cloroformo para retardar el crecimiento bacteriano, fracciones iguales de 0.4 ml de sobrenadante hidrolizado se toman para separar los estrógenos totales (E) y la testosterona total (T), la hidrólisis se usa para separar los sulfatos y el ácido glucurónico de los esteroides, maximizando así su cantidad para la prueba.

1000 cpm de esteroides repurificados (1,2,6,7-3h) testosterona y (2,4,6,7-3h) estradiol se adicionan en 0.1 ml de PBS para monitorear pérdidas metodológicas en las siguientes extracciones con 5 ml de éter dietilamino.

Los extractos de éter de cada muestra se secan con nitrógeno a 37 grados c. a chorro, se combinan se drenan y se reconstituyen en 1.1 ml de PBS, una fracción de 0.5 ml de cada muestra reconstituida se usa para la evaluación de recuperación y 0.5 ml De cada muestra se usa para radioinmunoensayo.

Se adiciona a PBS 0.1 ml de antisuero testosterona (S7147) plus .1 ml T-3h (9,000 cpm) para ensayo de testosterona y 0.1 ml de antisuero estriol (S3105) plus 0.1 ml E-3 estriol (12,000\*cpm) para prueba de estrógenos.

Los enlaces se separan por la adición de 0.2 ml de carbón dextrán (0.62%-0.062%) En PBS e incubado por 30 min. A 40 grados c.

El sobrenadante decantado se cuenta siguiendo una centrifugación a 2500 rpm por 10 min., Se comparan con estandares respectivos de diluciones seriadas de 0 a 1000 picogramos que se han corrido en paralelo. (5,6,8,9,10,12,26,31)

Los valores de la prueba se ajustan por pérdidas metodológicas y los valores E/T correspondientes se combinan para producir el rango E/T. (6,12)

La evaluación final reporta los resultados como un valor E/T, dentro de los individuos de la familia Psittacidae un valor o rango E/T bajo (0.5) Indica un macho, mientras que un rango alto E/T (2.0) Muestra una hembra, esta técnica además de indicarnos el sexo del ave nos puede mostrar si una ave adulta es sexualmente activa con un 90-97% de certeza. (5,6,8,9,10,12,26,31,32)

Del mismo modo, el parámetro usado para comparar los resultados, se basa en resultados obtenidos con anterioridad de aves que presentan dimorfismo sexual y que son de la misma familia que el ave a sexar, ya que los valores E/T varían enormemente entre familias.(7,12,26,31)

Esta técnica solamente se puede aplicar en aves mayores de 3 años, ya que las gónadas de aves jóvenes aun no secretan niveles medibles de esteroides, también hay aves que presentan una temporada reproductiva muy marcada, la cual es determinada principalmente por el fotoperíodo que influye en los niveles de esteroides secretados y excretados, otros factores que pueden influir en la producción hormonal son problemas clínicos, estrés crónico y deficiencias alimenticias.(6,8,31,32)

Se reporta que el margen de certeza es de 90 a 97% en aves sanas.

LITERATURA CITADA .



LITERATURA CITADA.

1. Abraham, G.E., Buster, J.E., Lucas, L.A., Corrales, P.C. and Teller, R.C.: Chromatographic separation of steroid hormones for use in Radioimmunoassay. Analyt. Lett., 5:509-517 (1972).
2. Alderton, D.: The Complete Cage and Aviary Handbook. Blitz, Singapore, 1992.
3. Austin Jr., O.: Birds of the World, parrots and their Allies. Octopus, London, 1988.
4. Bedolla, T.N., Ulloa, A.A., Landeros, B.J. y Pérez, P.G.: Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis, guía para la evaluación de resultados. Rev. Inv. Clin., 36:179-192, (1984).
5. Bercovitz, A.B., Czekala, N.M. and Lasley, B.L.: A new method of sex determination in monomorphic birds. J. Zoo Anim. Med., 2:114-124, (1978).
6. Bercovitz, A. B.: Birds sexing methods, which should you choose? Watchbird, 7:18-20 (1981).
7. Bercovitz, A. B.: Chick sexing with excretory steroids, possible, probable, no yet practical. Watchbird, 13:15-17 (1989).
8. Bercovitz, A.B., Collins, J., Price, P. and Tittle, D.: Non-invasive assessment of seasonal hormone profile in captive bald eagle (Haliaeetus leucocephalus). Zoo. Biol., 1:111-117 (1982).
9. Bercovitz, A. B., Frye, F. and Bain, J.: Endocrine fecology of immature birds. Watchbird, 11:38-44 (1984).
10. Bercovitz, A. B., Mirsky, A. and Frye, F.: Non-invasive differences in day old chicks (Gallus domesticus) by analysis of the immunoreactive estrogen excreted in the egg. J. Reprod. Fert., 74:681-686 (1985).
11. Bush, M.: Birds, laparoscopy and surgery. In: Zoo and Wild Animal Medicine. Edited by: Fowler, M. E., 478-491. W.B. Saunders. Philadelphia, 1988.
12. Czekala, N.M. and Lasley, M.L.: A technical note of sex determination in monomorphic birds using faecal steroid analysis. Int. Zoo. Yearbook, 17:209-211 (1978).

13. Delhanty, J. D. A.: Rapid chromosomal sexing of birds by direct and short term culture techniques. Vet. Rec., 22:922 (1989).
14. Elizondo, M. G.: Técnica de sexado quirúrgico en aves. Memorias del Curso Teórico Práctico sobre Manejo, reproducción y Crianza de Aves Silvestres en Cautiverio. Guadalajara. Jalisco, México. 1993. 20-23. Zoológico de Guadalajara. Guadalajara. Jalisco, México (1993).
15. Forshaw, J. M.: Parrots of the World. 2nd ed. Lansdowne, Melbourne, Australia, 1978.
16. García, V. G., Zárate, P. S., Calva, M. E. y Berruecos, V. M.: Ingeniería Genética en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Autónoma de Chiapas, Chiapas, México, 1991.
17. Gee, G. F.: Crane reproduction, physiology and conservation. Zoo. Biol., 2:199-213 (1983).
18. Glenn, D. B.: The testes, In: Basic and Clinical Endocrinology. Edited by: Green, S., Forshaw, P., 353-356. Lange Medical, Los Altos, California, 1986.
19. Goldfien, A. and Monroe, S. E.: The ovaries, In: Basic and Clinical Endocrinology. Edited by: Green, S., Forshaw, P., 387-391. Lange Medical, Los Altos, California, 1986.
20. Halverson, J.: Using DNA to sex birds. Birdtalk, 11:56-59 (1993).
21. James Jr., E. W.: Vertebrated reproduction. Wiley, Davis, California, 1988.
22. Kirk, W. R.: Terapéutica Veterinaria, Práctica Clínica en Pequeñas Especies. Vol. II. C.E.C.S.A., México, D. F., 1984.
23. Laguna, J. y Piña, G. E.: Bioquímica. 3a ed. La Prensa Médica Mexicana, México, D.F., 1981.
24. Lasley, B. L., Czekala, N. H., Monfort, S. L. and Bercovitz, A. B.: A dual radioimmunoassay and cytosol receptor binding assay for the measurement of oestrogenic compounds applied to urine, faecal and plasma samples. Steroids, 2:33-46 (1990).

25. Low, R.: *The Complete Book of Macaws*. American Consulting, New York, 1990.
26. Lyndal, B. and Bercovitz, A. B.: *Faecal steroid analysis, Nondisruptive technique for psittacine endocrine studies, conservation of new world parrots*. Parr. Work. Group, 2:65-71 (1989).
27. Maniatis, T., Fritsh, E. F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Davis, California, 1982.
28. Quinn, T. W., Cooke, F. and White, B. N.: *Molecular sexing of a geese using a cloned "Z" chromosomal sequence with homology to the "W" chromosome*. Auk, 107:199-202 (1975). 29.
29. Quiñones, D. M. y Castro, G.: *Aves canoras y deornato*. Bosques y Fauna, 12:3-9 (1975).
30. Silva, T. : *Psittaculture*. Silvio Mattacchue, Ontario, Canada, 1991.
31. Stavy, M., Gilbert, D. and Martin, R. D.: *Routine Determination of Sex in Monomorphic Birds Species Using Faecal Steroid Analysis*. Vol. I, Institute Zoological Society, London, 1978.
32. Tighe, H. M.: *Sexing of cage birds, traditional and future methods*. Tech. Vet., 8:314-318 (1987).
33. Tinajero, A. R.: *Manual de los Psitácidos más comunes en México. Tesis de licenciatura*. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1989.
34. Valentine, M.: *The Advantage of chromosome analysis*. Birdtalk, 11:114-117 (1992).
35. Vaughn, S.: *A Few Words About Sex*. 5th ed. Cage Bird Club of Northwest Tennessee, Tennessee, 1993.
36. Warwik, E. J. and Legates, J. E.: *Cría y Mejora del Ganado*. 1a ed. Mc-Graw Hill, Mexico, D.F., 1980.

ANEXO DE FIGURAS.



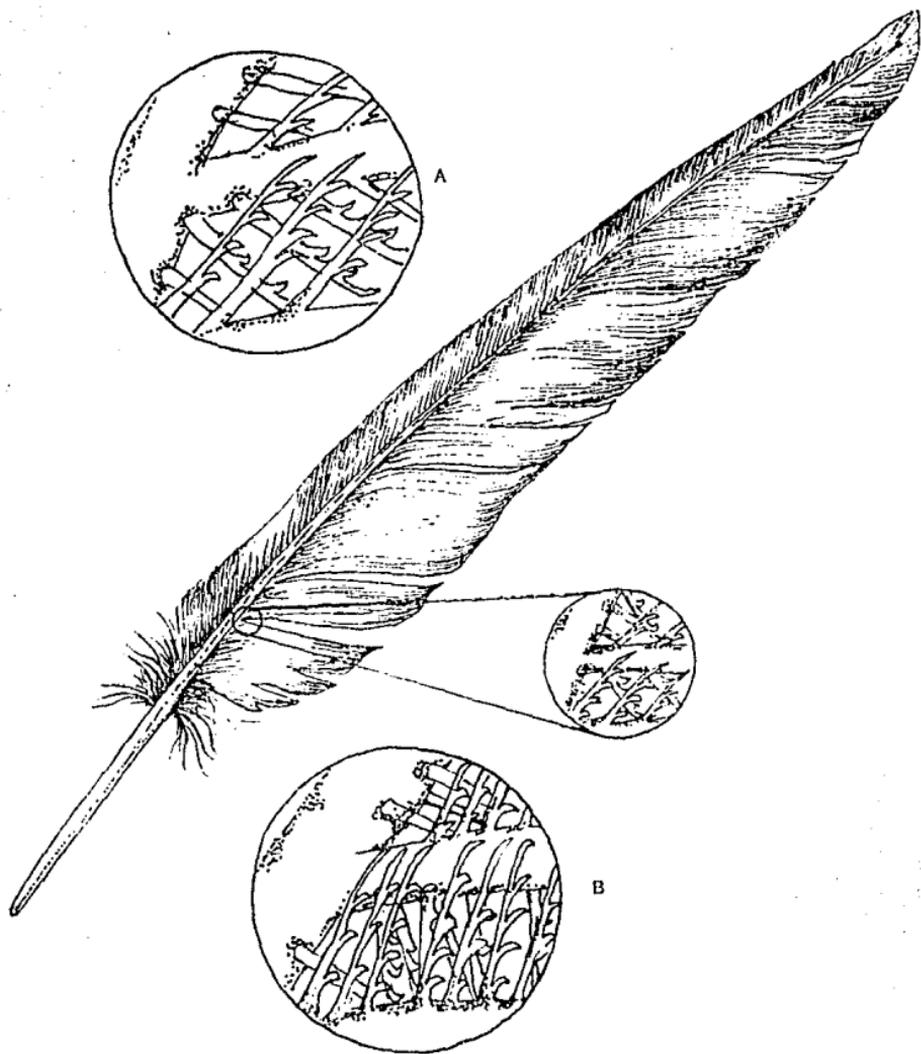


FIG.1 ESTRUCTURA DE LAS BARBICELAS O BARBILLAS DE LAS PLUMAS REMERAS PRIMARIAS DE MACHOS (A) Y HEMBRAS (B)

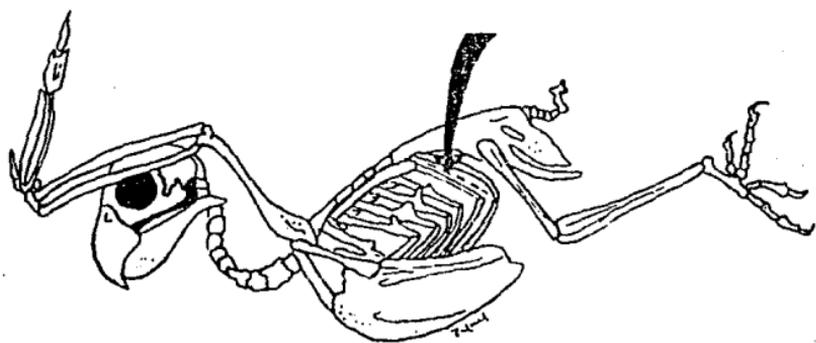


FIG 2. SITIO DE INCISION ENTRE LAS DOS ULTIMAS COSTILLAS (FLECHAS).

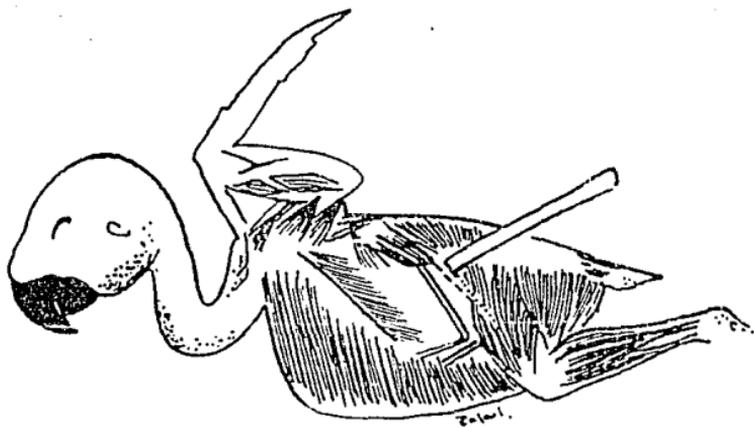


FIG.3. RETRACCION POSTERIOR DEL MUSCULO SARTORIO PARA DEJAR EXPUESTO EL SITIO DE LA INCISION.

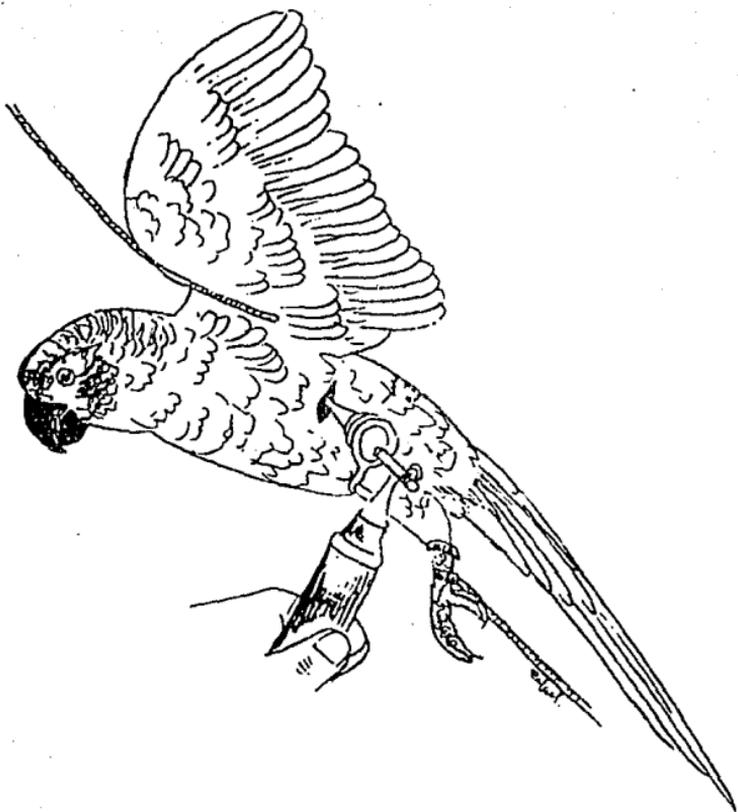


FIG.4. OTOSCOPIO COLOCADO EN POSICION PARA VISUALIZAR LAS GONNADAS.

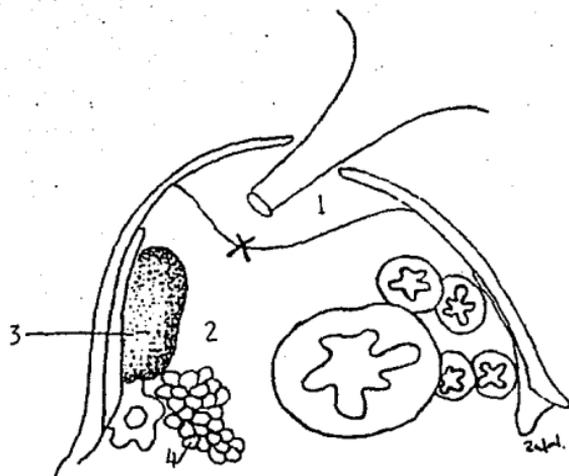


FIG.5. SECCION TRANSVERSAL DEL ABDOMEN DE UNA AVE QUE MUESTRA LA MEMBRANA DE LOS SACOS AEREOS QUE DEBE PUNCIONARSE EN EL SITIO MARCADO CON UNA X PARA PERMITIR LA VISION DE LA GONADA CON EL ESPECULO.

1 = SACO AEREO TORACICO POSTERIOR 2 = SACO AEREO ABDOMINAL

3 = RIÑON 4 = OVARIO

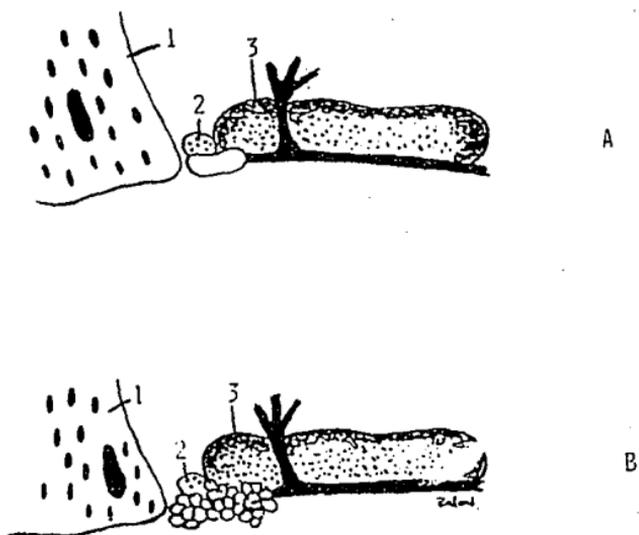


FIG.6. APARIENCIA DE LOS TESTICULOS EN EL MACHO (A) Y DEL OVARIO EN LA HEMBRA (B) Y MARCAS DE REFERENCIA ADYACENTES: (1) PULMON, (2) GLANDULA ADRENAL (3) RIÑON.

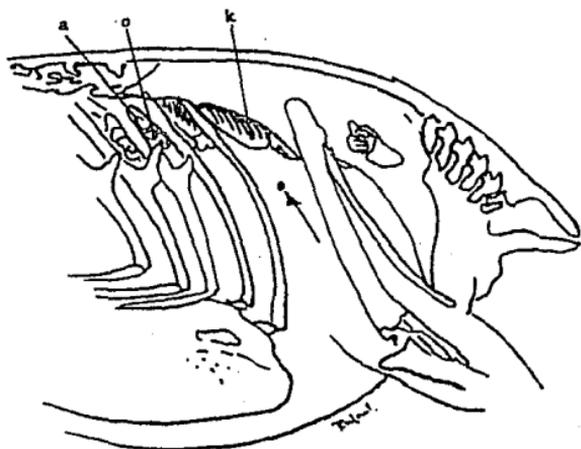


FIG.7. LAS MARCAS PARA LA LOCALIZACION DEL AREA OPTIMA PARA INTRODUCIR LA CANULA, SON LA ULTIMA COSTILLA, EL ILION, Y LA MITAD PROXIMAL DEL FEMUR; EL SITIO APROXIMADO ESTA MARCADO POR LA FLECHA Y EL PUNTO. a=ADRENAL o=GONADA Y k=RIÑON.

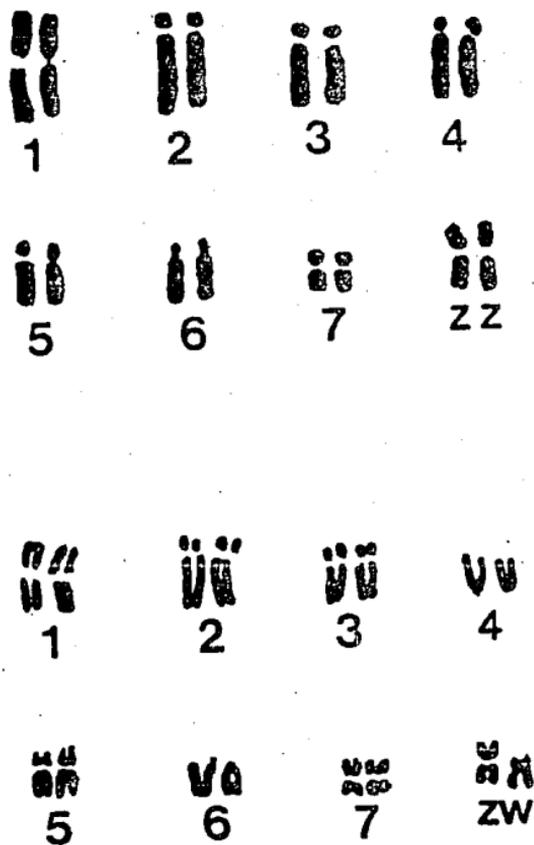


FIG.8. CARIOTIPOS DE UN MACHO (ZZ) Y DE UNA HEMBRA (ZW) DE GUA-CAMAYA SPIX (*Cyanopsitta spixii*).

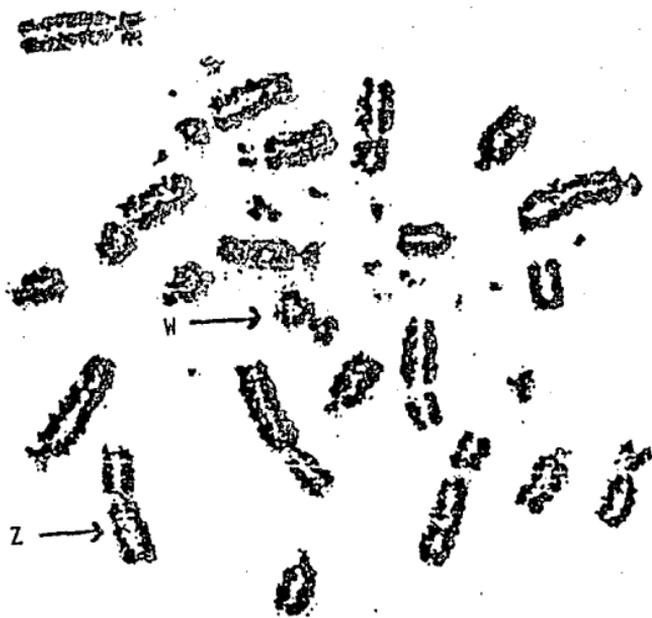


FIG.9. CARIOTIPO DE CROMOSOMAS EN EL ESTADIO DE METAFASE PERTENECIENTE A UNA HEMBRA DE AVE DEL AMOR *Agapornis roseicollis*; LAS FLECHAS INDICAN LOS CROMOSOMAS W Y Z, SE OBSERVA QUE EL CROMOSOMA W ES MAS PEQUEÑO.

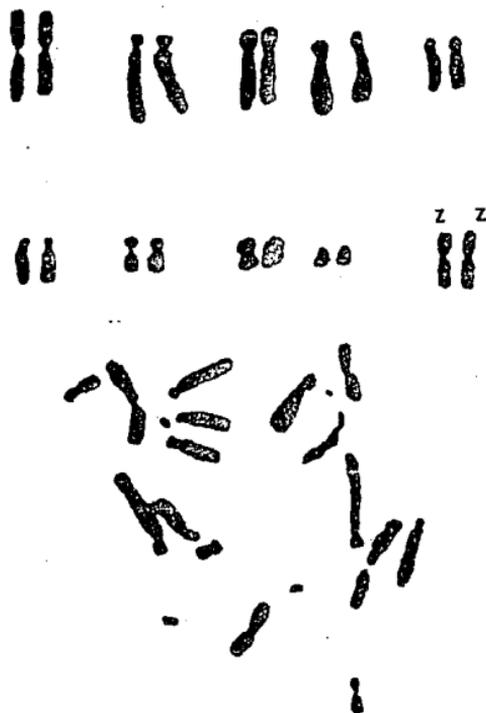


FIG.10. CARIOTIPO DE UNA GUACAMAYA ROJA MACHO *Ara macaco* OBTENIDO POR MEDIO DE CULTIVO DE SANGRE MEDIANTE UNA PREPARACION CROMOSOMICA.

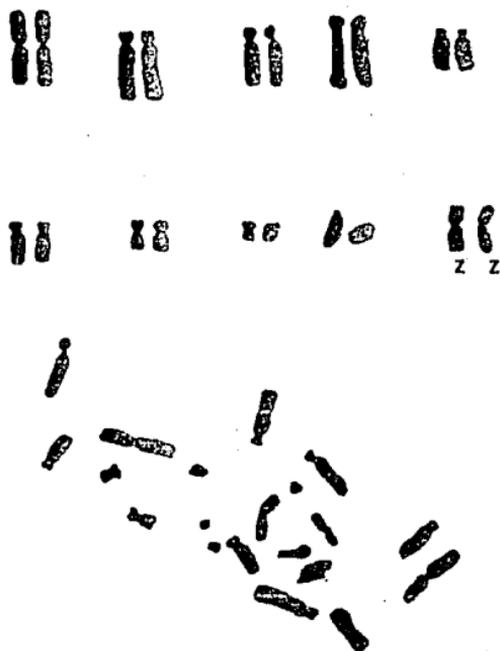


FIG.11. CARIOTIPO DE UNA GUACAMAYA ROJA MACHO *Ara macao* OBTENIDO POR MEDIO DE CULTIVO DE LA PULPA DE LA PLUMA MEDIANTE UNA PREPARACION CROMOSOMICA.

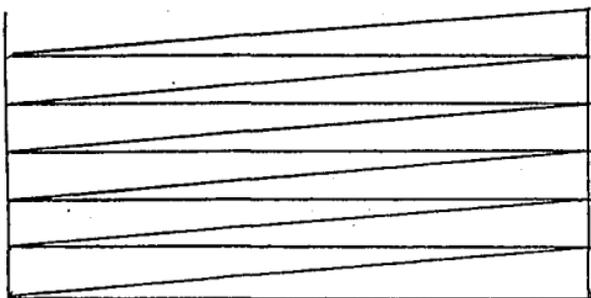


FIG.12. FORMA DE ALMACENAR LOS PORTAOBJETOS.

3. Se corta el DNA por medio de enzimas de restricción.

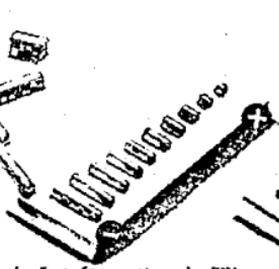


2. Se rompen las células sanguíneas para extraer y purificar el DNA.

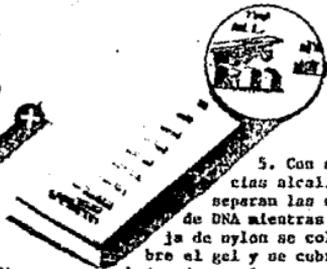


1. Mediante un pequeño corte en la uña del ave se obtiene la muestra que es recolectada en un tubo capilar el cual contiene un conservador.

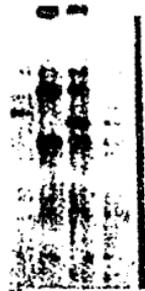
4. Los fragmentos de DNA se colocan en una cama de gel y se aplica una corriente eléctrica.



5. Con sustancias alcalinas se separan las cadenas de DNA mientras una hoja de nylon se coloca sobre el gel y se cubre con hojas de papel.



6. La hoja de nylon se sumerge en un baño radioactivo y se le agrega un fragmento de DNA de secuencia conocida y sus bases producen enlaces.



7. La muestra se expone a una película de rayos X y las bandas oscuras revelan el sitio de la prueba.

FIG.13. PROCEDIMIENTO PARA EL SEXADO DE PSITACIDOS EN CAUTIVERIO POR MEDIO DE IDENTIFICACION DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE DNA.

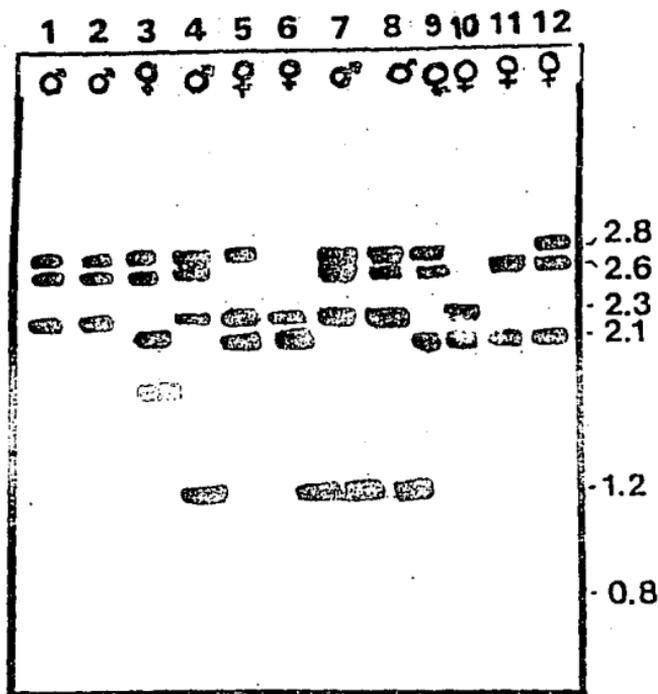


FIG.14. AUTORADIOGRAFIA DE DNA DE MACHOS Y HEMBRAS DE GANSCO DE LAS NIEVES *Chen caerulescens caerulescens*. LA MUESTRA FUE DIGERIDA CON LA ENZIMA DE RESTRICCION TAO 1, POSTERIORMENTE SE EFECTUO LA ELECTROFORESIS EN 1% DE AGAROSA Y TRANSFERIDA POR EL METODO SOUTHERN.

<i>T. aler</i>	Blue-spotted wood dove		
<i>T. brahami</i>	Blue-headed wood dove	II (Ghana)	01/01/78
<i>T. impatiens</i>	White-headed wood dove	II (Ghana)	21/05/78
<b>Order Psittaciformes:</b>	<b>All Parrots, Parakeets, Macaws and Lorikee</b>		
All species in order except those in App. I or with earlier date in App. II and except <i>Melospiza cinerea</i> and <i>Amygdalops holacanthus</i> .	<b>All Parrots, Parakeets, Macaws and Lorikee (not including the Budgerigar and Cockatiel)</b>		01/01/81
<i>Amecaesca alpestris</i>	Red-necked parrot		01/01/81
<i>A. barbata</i>	Yellow-shouldered parrot		01/01/81
<i>A. brasiliensis</i>	Red-tailed parrot		01/01/81
<i>A. subreana rhodocorytha</i>	Red-browed parrot		11/11/75
<i>A. guilfordi</i>	St. Vincent parrot		11/11/75
<i>A. versicolor</i>	Imperial parrot		11/11/75
<i>A. leucoceryx</i>	Cuban parrot		11/11/75
<i>A. pteror</i>	Red-speckled parrot		11/11/75
<i>A. tumida</i>	Tucuman amazon		01/01/81
<i>A. versicolor</i>	St. Lucia parrot		11/11/75
<i>A. vociferans</i>	Viscous parrot		11/11/75
<i>A. whitei</i>	Puerto Rican parrot		11/11/75
<i>Anodorhynchus glaucus</i>	Glaucous macaw		11/11/75
<i>A. hyacinthinus</i>	Hyacinth macaw		01/01/81
<i>A. leucor</i>	Lesser macaw, Indigo macaw		11/11/75
<i>A. leucor</i>	Buffon's macaw, Great green macaw		10/20/78
<i>A. glaucoceryx</i>	Cassidy macaw		01/01/81
<i>A. macaw</i>	Scarlet macaw		10/20/78
<i>A. maracana</i>	Miler's macaw		01/01/81
<i>A. mitis</i>	Military macaw		01/01/81
<i>A. nitropygia</i>	Red-fronted macaw		01/01/81
<i>A. orcesi</i>	Golden conure		11/11/75
<i>Cacajuba melanocephala</i>	Melucan cockatoo		01/01/81
<i>C. (=Kakapo) melanotos</i>	Long-billed cockatoo, Slender-billed cockatoo		21/01/77
<i>Calyptorhynchus bairdii</i>	Glossy cockatoo		21/01/77
<i>Conoccytus nigra berlyi</i>	Seychelles vasa parrot		11/11/75
<i>Cyanocitta stelleri</i>	Patagonian conure		01/01/81
<i>Cyanocitta stelleri</i>	Belt's macaw		11/11/75
<i>Cyanocitta stelleri</i>	Forbes's parakeet, Yellow-throated parakeet		11/11/75
<i>Cyanocitta stelleri</i>	Orange-fronted parakeet		11/11/75
<i>C. nana</i>	New Zealand parakeet, Red-fronted parakeet		11/11/75
<i>C. nana</i>	Antipodes green parakeet		11/11/75
<i>C. nana</i>	Horned parakeet		11/11/75
<i>C. nana</i>	Blue-collared parrot, Australian night parrot		11/11/75
<i>C. nana</i>	Orange-billed parakeet		11/11/75
<i>C. nana</i>	Scarlet-chested parakeet		11/11/75
<i>C. nana</i>	Yellow-chested conure		01/01/81
<i>C. nana</i>	Cook's fig parrot		21/01/77
<i>C. nana</i>	Ground parrot		21/01/77
<i>C. nana</i>	Red-capped parrot, Pheasant parrot		11/11/75
<i>C. nana</i>	Cape parrot		11/11/75
<i>C. nana</i>	Princess parrot		21/01/77
<i>C. nana</i>	Great black cockatoo, Palm cockatoo		11/11/75
<i>C. nana</i>	Mashed string parrot, Yellow-breasted moust parrot		11/11/75
<i>C. nana</i>	Golden-shouldered parakeet		11/11/75
<i>C. nana</i>	Paradise parakeet		11/11/75
<i>C. nana</i>	Blue-bonnet parakeet		21/01/77
<i>C. nana</i>	Mauritius ring-neck parakeet		11/11/75
<i>C. nana</i>	Ring-neck parakeet	II (Ghana)	21/01/78
<i>C. nana</i>	Príncipe parrot		11/11/75
<i>C. nana</i>	Blue-fronted parakeet, Ochre-marked parakeet		11/11/75
<i>C. nana</i>	Thick-billed parrot		11/11/75
<i>C. nana</i>	Maroon-fronted parrot		01/01/81
<i>C. nana</i>	Kakapo, Owl parrot		11/11/75
<i>C. nana</i>	Blue-naped parrot		21/01/77
<b>Order Cuculiformes:</b>	<b>Cuckoos, Pheasant-eaters:</b>		
<i>Ceryle alcyon</i>	Great blue heron	II (Ghana)	21/01/77
<i>Ceryle alcyon</i>	Grey plover eater	II (Ghana)	21/01/77
<i>Ceryle alcyon</i>	Violet heron	II (Ghana)	21/01/77
<i>Ceryle alcyon</i>	Krynnis louty	II	21/01/77
<i>Ceryle alcyon</i>	Black-to crested heron	II (Ghana)	21/01/77

FIG. 15. EN EL PRESENTE LISTADO PROPORCIONADO POR LA CASA COMERCIAL "ZOOGEN" SE MUESTRA PARTE DE LAS SONDAS QUE POSEEN PARA LLEVAR A CABO EL SEXADO DE AVES SILVESTRES POR MEDIO DE LA IDENTIFICACION DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE DNA.



CONVENTION ON  
INTERNATIONAL TRADE IN  
ENDANGERED SPECIES OF  
WILD FAUNA AND FLORA

- EXPORT PERMIT  
 EXPORT PERMIT  
 RE-EXPORT CERTIFICATE  
 EITHER CERTIFICATE (FORM M80 IS)

12/ 7/92  
US 7/1992  
12/ 7/92

1. Permitting Agency and Address <b>ZOOGEN, INC.</b> 1105 KENNEDY PLACE SUITE 4 DAVIS CA 95616 U.S.A.		2. Permitting Agency Name and Address (Optional)	
3. Species Information -MUST COMPLY WITH ATTACHED GENERAL PERMIT CONDITIONS. -VALID FOR MULTIPLE SHIPMENTS. -PERMIT MAY BE COPIED. PERMITTEE TO RETAIN ORIGINAL. -PERMITTEE MUST COMPLETE BLOCKS A, 11, AND 12 FOR EACH SHIPMENT. -NO ENDANGERED/THREATENED SPECIES ARE AUTHORIZED FOR IMPORT.		4. U.S. Department Number <b>OFFICE OF MANAGEMENT AUTHORITY U.S. FISH AND WILDLIFE SERVICE DEPARTMENT OF THE INTERIOR WASHINGTON D.C. 20240 UNITED STATES OF AMERICA</b> 12/ 7/92 Landing date U.S. Fish and Wildlife Service Number	
5. Country Name and to which Name applies and used to a sample of each	6. Scientific Name of specimen including subspecies, variety or number (Optional if none)	7. Sex	8. Quantity of origin
<b>BIRDS</b> ALL BIRDS	<b>BLOOD SAMPLES COLLECTED FROM SPECIMENS BORN IN CAPTIVITY TO BE USED FOR SEX DETERMINATION.</b>	9. <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	10. Quantity of origin Counted or weighed and determined to be
<b>BIRDS</b> ALL BIRDS	<b>BLOOD SAMPLES COLLECTED FROM CAPTIVE-BRED SPECIMENS OF WILD ORIGIN TO BE USED FOR SEX DETERMINATION.</b>	9. <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	10. Quantity of origin Counted or weighed and determined to be
<del>C. Country Name</del>	<del>Scientific Name</del>	<del>10. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></del>	<del>11. Quantity of origin Counted or weighed and determined to be</del>
<del>D. Country Name</del>	<del>Scientific Name</del>	<del>10. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></del>	<del>11. Quantity of origin Counted or weighed and determined to be</del>
12. Species or group identification The animal and/or species account upon importation/re-exportation must show the actual numbers of each item, group membership and date of issue.		13. Date of Issuance of this Permit Part of Exports to Free State Total No. of Shipping Containers	
14. Species or group identification The animal and/or species account upon importation/re-exportation must show the actual numbers of each item, group membership and date of issue.		15. This document shall only be returned to the issuing office, subject to any conditions of issue.	

FIG.16. FORMATO 3-201A (12/82) DEL "CITES" PARA ENVIO DE MUESTRAS SANGUINEAS CON EL FIN DE SEXAR AVES SILVESTRES EN CAUTIVERIO EN PELIGRO DE EXTINCION.

\* PROPORCIONADO POR LA CASA COMERCIAL "ZOOGEN".