

**VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE SEXAJE PÉLVICO POR COMPARACIÓN  
CON LA TÉCNICA DE SEXAJE POR ADN, EN LORAS *Amazona ochrocephala*  
MANTENIDAS EN CAUTIVERIO EN EL CENTRO DE REHABILITACIÓN DE  
FAUNA SILVESTRE DEL ORIENTE DE CALDAS, MUNICIPIO DE LA  
VICTORIA, DEPARTAMENTO CALDAS.**

**FARAH NATHALY GONZÁLEZ ORTEGA**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA  
SAN JUAN DE PASTO  
2012**

**VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE SEXAJE PÉLVICO POR COMPARACIÓN  
CON LA TÉCNICA DE SEXAJE POR ADN, EN LORAS *Amazona ochrocephala*  
MANTENIDAS EN CAUTIVERIO EN EL CENTRO DE REHABILITACIÓN DE  
FAUNA SILVESTRE DEL ORIENTE DE CALDAS, MUNICIPIO DE LA  
VICTORIA, DEPARTAMENTO CALDAS.**

**FARAH NATHALY GONZÁLEZ ORTEGA**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de  
Médico Veterinario**

**Presidente  
DELIO ORJUELA ACOSTA  
Médico Veterinario**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA  
SAN JUAN DE PASTO  
2012**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1º del acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

---

---

---

**DELIO ORJUELA ACOSTA M.V.Z. Presidente**

---

**FERNANDO GARZON GOMEZ M.V. Jurado Delegado**

---

**CAROL ROSERO GALINDO Biol. M. Sc. Ph. D. Jurado**

**San Juan de Pasto, 9 de febrero 2012**

## DEDICATORIA

*A mis abuelos quienes con su ejemplo me enseñaron a nunca desfallecer,  
A mis padres quienes con su sabiduría y paciencia siempre han guiado mis pasos  
y comprendido mis tropiezos,  
A mis hermanos por su alegría y fortaleza,  
A mis sobrinos, por enseñarme que la vida es un diario aprendizaje,  
A Arley, por ser el compañero de mis andanzas,  
A todos ellos, mis grandes amores, quienes comparten mis sueños y mis ilusiones.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Corporación Autónoma Regional de Caldas - CORPOCALDAS, por facilitar la autorización para la realización de esta investigación.

Al instituto de Genética de la Universidad Nacional – Grupo de Biodiversidad y Recursos Genéticos. Por brindarme asesoría técnica.

A Delio Orjuela por enseñarme incondicionalmente el arte de sanar animales silvestres y brindarme su apoyo incondicional.

Al Dr. Carlos del Valle, Mónica Franco, carolina, diana, Liliana, y a todas las personas con quienes compartimos este amor y pasión por los animales silvestres y además, quienes me brindaron su cooperación, sacrificando su tiempo y energías para ayudarme a sacar adelante este trabajo.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	18
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GENERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. MARCO TEÓRICO	22
4.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	22
4.2 BIOLOGÍA DE LA ESPECIE	22
4.3 MÉTODOS DE SEXAJE EN AVES	24
4.3.1 Laparotomía	25
4.3.2 Celoscopia (laparoscopia) para determinar el sexo	25
4.3.3. La citogenética como herramienta en el sexaje de aves	26
4.3.4 Sexaje por hormonas sexuales	27
4.3.5 Sexaje por comportamiento	27
4.3.6 Sexaje tradicionales.	28
4.3.7.1 Tamaño del individuo	28
4.3.7. 2 Sexaje pélvico	28
4.3.8 Sexaje molecular	28
4.3.8.1 Gen cromo helicasa ADN – CHD	29
4.3.3 Importancia del uso de la PCR en el sexaje de aves	30
4.3.8.2 Metodologías que hacen uso de la hibridación del DNA	31
4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
5. DISEÑO METODOLÓGICO	35
5.1 LOCALIZACIÓN	35
5.2 MUESTRA	35

5.3 VARIABLES	36
5.4 PROCEDIMIENTO	36
5.4.1 Sexaje pélvico.	37
5.4.2 Toma de muestras de sangre.	42
5.4.3 Determinación del sexo por ADN.	43
5.5 PROCESAMIENTO DE DATOS	46
5.5.1 Plan de análisis de datos.	46
6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
6.1 OBTENCIÓN DE LAS MEDIDAS DE LA DISTANCIA ENTRE LOS EXTREMOS DE LOS HUESOS DEL PUBIS EN INDIVIDUOS <i>Amazona ochrocephala</i>	48
6.2 COMPARACIÓN DEL SEXAJE PÉLVICO CON LOS RESULTADOS DEL SEXAJE POR ADN EN LOS ANIMALES ESTUDIADOS.	48
6.3 ESTABLECIMIENTO DE LOS RANGOS DE MEDIDAS DE LA DISTANCIA DE LOS HUESOS DEL PUBIS PARA HEMBRAS Y MACHOS DE LA ESPECIE <i>Amazona ochrocephala</i> .	51
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
7.1 CONCLUSIONES	53
7.2 RECOMENDACIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXOS	59



## LISTA DE TABLAS

	<b>pág.</b>
Tabla 1. Identificación, peso y condición corporal de los individuos <i>Amazona ochrocephala</i> analizados.	39
Tabla 2. Medida de la distancia de los extremos de los huesos del pubis y sexaje pélvico de los individuos <i>Amazona ochrocephala</i> obtenidas con los animal conscientes.	39
Tabla 3. Medida de la distancia de los extremos de los huesos del pubis y sexaje pélvico de los individuos <i>Amazona ochrocephala</i> obtenidas con los animal anestesiados.	41
Tabla 4. Sexo de los individuos determinado por técnica molecular.	45
Tabla 5. Concordancia observada sexaje pélvico y sexaje por ADN	49

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura.1. <i>Amazona ochrocephala</i>	24
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Amazona ochrocephala</i> en Colombia.	24
Figura 3. Restricción física y transporte de animales.	37
Figura 4. Pesaje y manejo del animal	38
Figura 5. Toma de la medida de la distancia de los extremos de los huesos del pubis con el animal sin anestesia	38
Figura 6. Toma de medida de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis con un Calibrador Vernier, con el animal anestesiado.	41
Figura 7. Extracción de plumas	42
Figura 8. Toma de muestra de sangre mediante punción de la vena Ulnar	42
Figura 9. Recuperación de la anestesia de los individuos.	43
Figura 10. Realización del sexaje molecular	44
Figura 11. Visualización de bandas de amplificación visible en la electroforesis del gel de agarosa	44
Figura 12. Gráfico de barras de error simple, entre la media de la de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis y sexaje por ADN	52

## LISTA DE ANEXOS

	<b>pág.</b>
Anexo A. Protocolos de extracción y PCR	60

## GLOSARIO

**ADN:** ácido desoxiribonucleico, material genético básico de una célula. Contiene típicamente dos cadenas polinucleotídicas en forma de doble hélice.

**CEBADOR:** es una secuencia corta de ácido nucleico que actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

**DIMORFISMO SEXUAL:** es la diferencia de formas, coloración y tamaños entre machos y hembras de una misma especie.

**ELÉCTROFORESIS:** técnica de separación de mezclas de moléculas orgánicas basadas en distintas velocidades de desplazamiento de las moléculas en un campo eléctrico.

**EXONES:** secuencias de ADN específicas de genes, que codifican secuencias de aminoácidos en las proteínas.

**FAUNA SILVESTRE:** al conjunto de organismos vivos de especies animales terrestres (anfibios, reptiles, aves y mamíferos), que no han sido objeto de domesticación, mejoramiento genético, cría regular o que han regresado a su estado salvaje.

**FENOTIPO:** manifestación externa de un genotipo.

**GEN:** unidad básica de la herencia, es una secuencia ordenada de nucleótidos en la cadena de ADN que cumple una función específica y ocupa una posición determinada en el cromosoma.

**GENOTIPO:** Es el conjunto de genes que contiene un organismo heredado de sus progenitores

**INTRONES:** secuencias de ADN no codificante.

**SEXAJE:** determinación del sexo de un individuo

**REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA:** técnica molecular que permite producir un enorme número de copias de una secuencia de ADN específica.

**PLASTICIDAD FENOTÍPICA:** es la propiedad de un genotipo de producir diferentes fenotipos en respuesta a diferentes condiciones ambientales.

**PSITÁCIDA (PSITTACIDAE):** es una familia de aves psitaciformes llamadas comúnmente loros o papagayos, e incluye a los guacamayos, las cotorras, los periquitos, los agapornis y formas afines.

## RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de determinar la validez de la técnica de sexaje pélvico mediante su comparación con la técnica de sexaje por ADN, en individuos *Amazona ochrocephala* mantenidos en cautiverio en el centro de rehabilitación de fauna silvestre del oriente de Caldas, municipio de Victoria, departamento de Caldas, Colombia.

Para este fin se utilizaron 44 individuos de la especie *Amazona ochrocephala* a los cuales se les tomó la medida de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis. Este procedimiento se realizó con el animal consciente y anestesiado. Para Mitcehell y Tully 2009, el sexaje pélvico consiste en la palpación de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis con el dedo índice, donde las hembras tienen la distancia más amplia que los machos. Por lo que en este estudio se identificó como machos a los individuos con medidas menores a un centímetro y como hembras a individuos con medidas superiores a un centímetro.

Para obtener el ADN, se extrajo una cantidad de 0,1 a 0,2 ml de sangre, obtenida mediante punción de la vena ulnar. Las muestras se depositaron en tubos con etanol, los cuales se transportaron hasta el Laboratorio de Genética de la Universidad Nacional, donde se llevó a cabo el sexaje molecular de 40 de los 44 individuos muestreados. Para la reacción en cadena de polimerasa (PCR) se utilizaron los cebadores 2550F(5'-GTTACTGATTCGTC-TACGAGA-3') y 2718R(5'-ATTGAAATGATC-CAGTGCTTG-3). Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 3.5%. La asignación del sexo se realizó por la presencia de dos bandas en las hembras o en los machos por la presencia de una sola.

En este estudio, la técnica de sexaje pélvico en loros *Amazona ochrocephala* no produjo resultados lo suficientemente comparables e intercambiables con el sexaje molecular. Lo cual no permitió soportar su validez. Esto se debió probablemente a que la morfología y el crecimiento de los individuos evaluados, se vieron afectados por la plasticidad fenotípica. Ya que estos fueron víctimas del tráfico ilegal, el cual generalmente nunca deja información del animal confiscado. Generando un vacío en el conocimiento de las condiciones ambientales de toda su historia vital, tales como procedencia geográfica, tipo de alimentación, enfermedades padecidas o variedad de condiciones que pudieron hacer que su fenotipo haya variado independientemente en cada uno de los ejemplares estudiados.

Al determinar si había diferencias en las medidas de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis, entre los machos y hembras estudiados, se encontró que no había diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

## ABSTRACT

The following study was carried out with the objective of determining the validity of the pelvic sexing technique through its comparison with the DNA sexing technique in individuals of *Amazona ochrocephala* that are kept in captivity in the Wildlife Rehabilitation Center located at the municipality of Victoria in the east region of the department of Caldas in Colombia.

To this end, 44 individuals from the *Amazona ochrocephala* specie were used to measure the distance between the furthest points of the pubic bone. This procedure was carried out with the animal in a conscious state but anesthetized. For Mitchell y Tully 2009, the males have a shorter distance than females, so for this study, the males were identified as the individuals with measurements shorter than one centimeter and the females as the individuals with measurements longer than one centimeter.

As a way to obtain the DNA, some blood (0.1 to 0.2 ml) through a puncture on the Ulnar vein was extracted. The samples were placed in test tubes with ethanol and were taken to the Genetics Lab at "Universidad Nacional" where the molecular sexing of 40 out of 44 sampling individuals was carried out. For the polymerase chain reaction (PCR), the 2550F(5'-GTTACTGATTCGTC-TACGAGA-3') and 2718R(5'-ATTGAAATGATC-CAGTGCTTG-3) primers were used. The amplified products were separated through electrophoresis in a 3.5% Agarose gel. The sex assignment was carried out because of the presence of two bands in the female individuals and one band in the male ones.

In this study, the pelvic sexing technique in *Amazona ochrocephala* parrots did not produce enough results to be compared and interchanged with the molecular sexing technique, situation that did not allow supporting its validity. All of this could happen because the morphology and the growing of the evaluated individuals were affected by the phenotypic plasticity. Because the animals used for the sampling came from the illegal wildlife trade, it is not possible to have accurate information related to the environmental conditions of their vital history like their geographic origin, type of feeding, illnesses or the variety of conditions that could make that the phenotype had independently changed in each one of the studied samples.

It was found that there were not meaningful statistical differences in the distance measurements between the furthest points of the pubic bone in the males and females studied.

## INTRODUCCIÓN

Para Gómez<sup>1</sup>, en Colombia el 46,11% de los decomisos de especímenes de fauna silvestre corresponden a aves, dentro de ellas la familia *Psittacidae*, de la cual hacen parte los loros, es la de mayor demanda en el mercado de mascotas, debido a sus llamativos colores y comportamiento social. Por esta razón los loros *Amazona ochrocephala*, entran en grandes cantidades a los centros de atención y valoración – CAV y centros de rehabilitación.

Según Fridolfsson y Ellegren<sup>2</sup> la información del sexo de cada individuo es muy importante para los estudios de ecología, cría y conservación. Robaldo y Neto<sup>3</sup> afirman que no hay un dimorfismo sexual externo en la mayoría de loros de Sur América, entre ellos la especie *Amazona ochrocephala*, lo cual implica un problema en programas de rehabilitación, reproducción, repoblación, y en el diagnóstico apropiado de enfermedades limitadas al sexo, entre otros.

El sexaje pélvico según Mitchehell y Tully<sup>4</sup> consiste en la palpación de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis con el dedo índice, donde las hembras tienen la distancia más amplia del pubis que los machos. Por otra parte Latermann<sup>5</sup> afirma, que como resultado de esto, cuando están sentados normalmente los miembros posteriores de un macho están menos separados que los de una hembra. Sin embargo hasta ahora, ningún estudio científico ha presentado datos en los que se haya reportado la confiabilidad de esta técnica.

Según Fridolfsson y Ellegren<sup>6</sup>, en las aves las hembras son heterogaméticas (ZW) y los machos son homogaméticos (ZZ). El sexaje molecular en aves no ratites, se

---

<sup>1</sup> GOMEZ M. Estadísticas del uso ilegal de fauna silvestre en Colombia, Ministerio del Medio Ambiente Dirección General de Ecosistemas Grupo de Biodiversidad, 2002.

<sup>2</sup> FRIDOLFSSON A y ELLEGREN H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. En: Journal of Avian Biology. Marzo, 1999. vol. 30, no. 1. p.116-121.

<sup>3</sup> ROBALDO G. N. y NETO S. P. Order psittaciformes (parrots, macaws, conures). En: FOWLER M.E. y CUBAS Z.S. Biology, medicine and surgery of south american wild animals. Iowa, Iowa State University Press, 2001. p.168

<sup>4</sup> MITCHEHELL, Mark; TULLY, Thomas. En: Manual of exotic pet practice . Saunders Elsevier, 2009. p.253.

<sup>5</sup> Latermann, Werner. New parrot handbook. New York. Barrows, 1985. pg. 57

<sup>6</sup> FRIDOLFSSON A y ELLEGREN, Op. cit., p 117.



basa en la detección de la diferencia de tamaño de los intrones CHD1W y CHD1Z, usando cebadores altamente conservados que flanquean el intrón. En la amplificación por PCR y la electroforesis de agarosa, las hembras se caracterizan por mostrar dos fragmentos (CHD1W y CHD1Z), mientras que los machos sólo muestran un fragmento (CHD1Z) claramente diferenciables por su tamaño. Igualmente afirman que el método PCR es rápido y fiable.

Como lo manifiesta Collar y Juniper<sup>7</sup>, la creciente preocupación en torno al deterioro del recurso fauna, ha contribuido a fomentar la búsqueda de alternativas a través de la investigación básica que propicien y proporcionen un aprovechamiento sostenible del mismo y que permitan además el mantenimiento de nuestro patrimonio faunístico, resaltando la necesidad de promover estudios que hagan parte de estrategias fundamentales para la conservación, como el análisis del sexo en individuos que hacen parte de programas de reproducción en cautiverio y rehabilitación.

Por todo lo anterior es fundamental determinar ¿Cuál es la validez de la técnica de sexaje pélvico al compararla con la técnica de sexaje por ADN en loras *Amazona ochrocephala* mantenidas en cautiverio en el centro de rehabilitación de fauna silvestre del oriente de Caldas en el municipio de Victoria, departamento Caldas?

---

<sup>7</sup> Collar NJ, Juniper AT. Diminisions and causes of the parrot conservation crisis, international council of bird preservation. Tech publ 1991. Citado por, Stell C, Jimenez LM y Sanches CA en el artículo LA CITOGENETICA COMO HERRAMIENTA EN EL SEXAJE DE LAS AVES. I Congreso internacional de Medicina y Aprovechamiento de fauna Silvestre Neotropical. Agosto 25 – 27, 2005. Bogota Colombia.

## 1. DEFINICIÓN Y DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA

La especie de loros *Amazona ochrocephala* es señalada como especie fuera de peligro por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza - UICN<sup>8</sup>. Por otra parte se encuentra en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres<sup>9</sup>. A pesar de esto, según Rodríguez<sup>10</sup> esta es la especie más perseguida de su género como ave de jaula, razón por la cual ingresa en grandes cantidades a los Centros de Atención y Valoración de Fauna (CAV) y centros de rehabilitación como resultado de decomisos y entregas voluntarias.

Según Londoño<sup>11</sup>, los individuos de la especie *Amazona ochrocephala*, como en la mayoría de especies de psitácidos, la determinación del sexo presenta dificultades debido a la ausencia de dimorfismo sexual externo, por lo cual se torna difícil la conformación de parejas y grupos en procesos de rehabilitación y reintroducción en su hábitat natural. Ante esta realidad, se cuenta con métodos de sexaje como: la endoscopía, determinación de niveles hormonales, cariotipo y observación del comportamiento; sin embargo, estas técnicas presentan desventajas debido a que son riesgosas, costosas, estresantes, traumáticas, complejas o demandan mucho tiempo.

En la actualidad, el método más eficaz, para el sexaje de aves, es el análisis genético, sin embargo, no es de fácil acceso en la mayoría de los centros de rehabilitación de nuestro país, debido a la gran cantidad de animales presentes en estos y los costos que implica el procedimiento.

En procedimientos clínicos, el no conocer el sexo del paciente a tratar, de forma fácil y rápida, durante el examen físico, dificulta diagnosticar enfermedades limitadas por el sexo. Por eso según Lugo Carvajal<sup>12</sup>, los problemas reproductivos

---

<sup>8</sup> BirdLife International 2009. *Amazona ochrocephala*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. consultada el 19 enero 2011.

<sup>9</sup> CITES especies data base. <http://www.cites.org/eng/resources/species.html>. citada en 19 de enero 2011

<sup>10</sup> RODRIGUEZ MAHECHA, Jose, *et al.* Loros, pericos y guacamayas neotropicales. Bogotá D.C: Copyright, 2005.186 p.

<sup>11</sup> LONDOÑO ZAPATA, Carmen. Avifauna de la Universidad de Antioquia. Medellín: Universidad de Antioquia, 2006. p 24.

<sup>12</sup> LUGO CARVAJAL. Consideraciones especiales para la reproducción de aves psitácidas nativas y exóticas. En: Memorias de la conferencia interna en medicina y aprovechamiento de fauna silvestre, exótica y no convencional. 2011.

son comunes en las aves psitácidas, pero su diagnóstico se dificulta debido a la ausencia de dimorfismo sexual.

El sexaje pélvico es una técnica que consiste en la palpación de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis con el dedo índice, según esta técnica las hembras tienen la distancia más amplia del pubis que los machos. Latermann<sup>13</sup> afirma, que como resultado de esto, cuando están sentados normalmente los miembros posteriores de un macho están menos separados que los de una hembra. Esta técnica se utiliza de manera empírica, donde cada persona tiene una medida subjetiva de la distancia de los extremos de los huesos del pubis, sin tener un rango de medidas exactas que le permita diferenciar entre macho o hembra, llevando así a una identificación imprecisa de los individuos.

---

<sup>13</sup>LATERMANN, Werner. Op cit . p. 57

## 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es la validez de la técnica de sexaje pélvico al compararla con la técnica de sexaje por ADN en loras *Amazona ochrocephala* mantenidas en cautiverio en el centro de rehabilitación de fauna silvestre del oriente de Caldas en el municipio de Victoria, departamento Caldas?

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Conocer la validez de la técnica de sexaje pélvico mediante su comparación con la técnica de sexaje por ADN en loras *Amazona ochrocephala* mantenidas en cautiverio en El Centro de Rehabilitación de Fauna Silvestre del Oriente de Caldas en el municipio de Victoria, departamento Caldas.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener las medidas de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis en individuos *Amazona ochrocephala*.
- Comparar el sexaje pélvico con los resultados del sexaje por ADN en los mismos animales.
- Establecer los rangos de medidas de la distancia de los huesos del pubis para hembras y machos de la especie *Amazona ochrocephala*.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Aguilar, contempla la siguiente clasificación taxonómica:

Clase	Aves
Subclase	Neornithes
Infraclase	Neoaves
Parvclase	Passerae
Superorden	passerimorphae
Orden	passeriformes
Familia	psittacidae
Subfamilia	Ariniae (psittacinae )
Tribus	Arini
Género	Amazona
Especie	Amazona ochrocephala <sup>14</sup>

### 4.2 BIOLOGÍA DE LA ESPECIE

Según Rodríguez *et al*, “entre los diferentes nombres de la lora *Amazona ochrocephala* se encuentran: Yellow-crowned Amazon o Yellow-headed Parrot (inglés), Loro fino o Lora común (Col.), *Amazona coroniamarilla* o Loro coronado(Ecu.)”<sup>15</sup>.

Para Hilty y Brown, la Identificación se basa por la presencia de: “pico pálido con extremo pardusco. Principalmente verde, con centro de coronilla amarillento; rémiges con ápice azul; hombros y parche en secundarias rojos; pequeña extensión roja en la base de la cola”<sup>16</sup>, como se ilustra en la figura 1.

Los mismos autores afirman que es la “única *Amazona* colombiana con parche

---

<sup>14</sup> AGUILAR H. Algunas notas sobre el loro real *Amazona ochrocephala* (Psittacidae: psittacinae: arini) en Venezuela [en línea]. Revista de ecología latinoamericana. 2001. vol. 08, no. 1. p.19. [citado el marzo 23, 2011]. Disponible en internet: < <http://www.ciens.ula.ve/~cires/recol-v8n1a03.pdf> .>

<sup>15</sup> RODRIGUEZ MAHECHA, José, *et al*. Loros, pericos y guacamayas neotropicales. Bogotá D.C: Copyright , 2005.p. 144

<sup>16</sup>HILTY, Steven. y BROWN, William. En: A guide to the birds of Colombia. Copyright. 2001. p. 262

amarillo en la coronilla y resto de la cabeza verde”<sup>17</sup>.

Carmen Londoño expone que:

Respecto a sus costumbres y hábitat, estas aves se observan en parejas y bandadas ruidosas. En ocasiones de hasta 300 ejemplares. Se posan para dormir y comer semillas, frutas y flores en las copas de los árboles. Son consideradas como las loros que mejor aprenden a hablar, lo que infortunadamente las hace preferidas como aves domésticas. Son oportunistas en la alimentación y se reúnen en pequeños grupos en las copas de los árboles. Utilizan como nidos cavidades, termiteros y palmas muertas con frecuencia bajas. Se encuentran en bosques húmedos y caducifolios, en tierras bajas, zonas abiertas, sabanas con árboles dispersos, cerca de los ríos, zonas residenciales y en muchas jaulas<sup>18</sup>.

Para Rodríguez y Hernández, la distribución geográfica en Colombia de la *Amazona ochrocephala* es:

*Amazona ochrocephala nattereri*: ocupa el piedemonte andino en el departamento del Caquetá (Morelia) y del Putumayo (Umbría), y su límite meridional accidental no se ha precisado.

*Amazona ochrocephala ochrocephala*: se encuentra en la cuenca del río Catatumbo, la Orinoquia y la Amazonia (excepto en el área ocupada por *A. o nattereri*), probablemente hasta la orilla colombiana del río Amazonas.

*Amazona ochrocephala panamensis*: se distribuye desde el norte del Chocó, en el bajo Atrato a través de la planicie costera del Caribe y las estribaciones occidentales y el sur del macizo de la Sierra Nevada de Santa Marta, hasta el sur de la Guajira; penetra igualmente en la parte baja del valle del río Cauca, y por el valle del río Magdalena llega hasta el Parque Nacional Cueva de los Guácharos<sup>19</sup>. Como se aprecia en la figura 2.

Para Rodríguez *et al*, el estado de conservación de la especie *Amazona ochrocephala* es: “no considerada bajo ninguna categoría de amenaza a nivel global, aunque es la más perseguida de su género como ave de jaula”<sup>20</sup>.

---

<sup>17</sup> Ibid, p. 262

<sup>18</sup> LONDOÑO ZAPATA, Carmen. Avifauna de la Universidad de Antioquia. Medellín: Universidad de Antioquia, 2006. p. 26

<sup>19</sup> RODRÍGUEZ, José y HERNÁNDEZ, Jorge. Loros de Colombia. Conservación Internacional 2002. P326 ‘ 330.

<sup>20</sup>. RODRIGUEZ MAHECHA, José *et al*. Op. cit., p. 144

Figura 1. *Amazona ochrocephala*

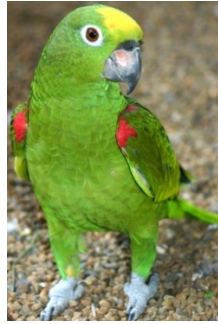
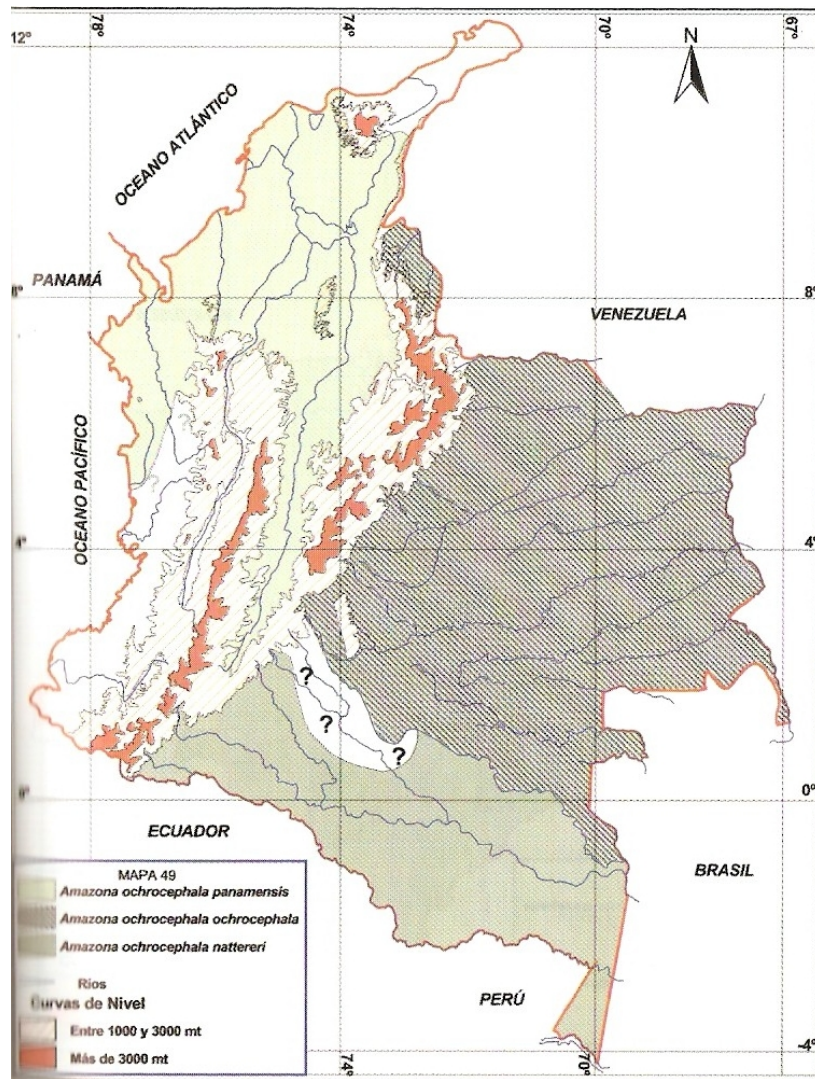


Figura.2. Distribución geográfica de *Amazona ochrocephala* en Colombia.



Tomada del Libro Loros de Colombia. Rodríguez y Hernández



### **4.3 MÉTODOS DE SEXAJE EN AVES.**

#### **4.3.1 Laparotomía. LEWIS *et al*, exponen:**

La laparotomía penetra la cavidad corporal y, por lo tanto, es considerada como un procedimiento de cirugía mayor. La laparotomía exploratoria tiene varios usos. Puede proporcionar información sobre el sexo de especies monomórficas, y el estado de desarrollo de sus gónadas, y también indicar la actividad de otros órganos.

En el laboratorio y en el campo cuando sea posible, el isoflurano es un anestésico ideal para este procedimiento. Cualquier herida no cerrada puede ser una ruta de infección y herniar los tejidos y órganos laparotomía deben cerrarse. Los pegamentos quirúrgicos cumplen bien este propósito. Las heridas en aves acuáticas deben de ser suturadas para reducir la infección. En aquellas especies zambullidoras, la herida debe de ser sellada para evitar la penetración de agua en la cavidad corporal<sup>21</sup>.

#### **4.3.2 Celoscopia (laparoscopia) para determinar el sexo. Samour, explica:**

Las consideraciones preoperatoria para la celoscopia en los pacientes aviarios son parecidas a las de la cirugía general. Es esencial una exploración clínica completa, además de información sobre la edad, dieta, alojamiento y el manejo en general. Las aves longevas y obesas alojadas de forma incorrecta y que se alimenta con dietas inadecuadas tienen muchos riesgos anestésicos, y las falconiformes y psitácidas especialmente.

La selección de la técnica anestésica varía según la especie y las circunstancias a las que tienen que enfrentarse al especialista en aves. Se han utilizado con éxito anestésicos inyectables en alrededor de 10.000 exploraciones endoscópicas en aproximadamente 350 especies de aves diferentes. Los protocolos anestésicos incluyen ketamina, ketamina combinada con xilacina y alfaxalona-alfadolona. El isoflurano es el fármaco de elección para muchos clínicos especializados en aves.

El paciente aviario se ubica en decúbito lateral derecho con las alas plegadas en la posición anatómica normal. La pata izquierda se extiende completamente hacia delante y la cara lateral del abdomen se prepara para la cirugía. Deben quitarse todas las plumas de la zona y cepillarse y desinfectarse adecuadamente.

---

<sup>21</sup> LEWIS, Gaunt., KENNETH, Oring., Daniel W. Anderson., Luis F. Baptista., Jon C. Barlow ., y John C. Wingfield Guía para la utilización de aves silvestres en investigación. Gaunt. Lewis W. Oring., Kenneth P. Able., Daniel W. Anderson., Luis F. Baptista., Jon C. Barlow ., y John C. Wingfield

Generalmente, las gónadas se localizan en la base anterior del lóbulo craneal del riñón, formando un triángulo con la glándula adrenal en la parte frontal. Una de las mayores ventajas de determinar el sexo mediante visualización directa es que además es posible obtener información útil sobre el estado de salud del animal.

Los ovarios y testículos sufren cambios estacionales espectaculares a lo largo del año, por lo que las variaciones de tamaño, color y aspecto son características claves importantes para evaluar el estado reproductivo. Las gónadas de algunas especies de aves, como las cacatúas, los tucanes, los turacos y otras, están pigmentadas debido a que tienen depósitos de melanina. Igualmente estas muestran un amplio rango de coloración, desde gris pálido, azul verdoso pálido y verde pálido hasta un color verde metálico oscuro a negro en individuos inmaduros y sexualmente inactivos. El color de los órganos reproductivos cambia según la estacionalidad y tiene que ver con los cambios morfológicos. Por ejemplo, el peso de los testículos de un ave macho puede aumentar de 10 – 500 veces<sup>22</sup>.

#### **4.3.3 La citogenética como herramienta en el sexaje de aves. Stell, Gimenez y Sanches, explican que:**

Los estudios cromosómicos en aves quizás presenten inconvenientes al análisis, debido a las dificultades para el conteo de los microcromosomas (los cuales constituyen una gran parte del cariotipo). Esto hace que no haya certeza total acerca del número diploide exacto de las especies analizadas. Otro problema son los cultivos de células aviarias, los cuales no han sido tan efectivos como los cultivos de células mamíferas. Adicionalmente no hay reglas específicas para la separación entre macro y microcromosomas y en ocasiones el pequeño tamaño de los microcromosomas ha hecho difícil su análisis al microscopio de luz.

Los cromosomas sexuales juegan un papel importante en los estudios comparativos entre especies aviarias. En las aves los dos sexos están claramente diferenciados desde el punto de vista genético. El sexo de las aves está determinado por la presencia del cromosoma W, descubierto por T. Frederic hacia 1961. Esto permitió establecer que en las aves hay dimorfismo cromosómico sexual, dentro del cual el macho es homogámico (ZZ) y la hembra es heterogámica (ZW). Posibles dificultades en el estudio de estos cromosomas se atenuaron con la introducción de nuevas técnicas (bandeo C).

La técnica de bandeo C señala por medio de una tinción especial la presencia de heterocromatina constituida en un cromosoma (regiones condensadas e inactivas). Esta técnica demostró ser la más útil para identificar el cromosoma W de las aves comunes, por cuanto estos se teñían más que las otras estructuras. El primer

---

<sup>22</sup> SAMOUR, Jaime. Medicina Aviaria. 2 ed. Barcelona. Elsevier, 2010.p. 121 – 123.

reporte de un patrón de heterocromatina constitutiva en aves (Bandas C) fue realizado por Stephos y Arrigui en 1971. Las ocho especies estudiadas, pertenecientes al orden de los galliformes y craciformes presentaron regiones de bandas C positivas a nivel de los microcromosomas y del cromosoma sexual W. Este último presentó un aspecto característico, era pequeño y se teñía casi totalmente con gran intensidad<sup>23</sup>.

#### 4.3.4 **Sexaje por hormonas sexuales.** Antunes y Alvarenga, señalan que:

Los estudios empezaron a medir los niveles plasmáticos de esteroides sexuales a través de la radioinmunoanálisis (RIA). Más tarde, en busca de un enfoque no invasivo, menos estresante y menos traumático, se centra en la cantidad de esteroides a través de las excretas. A través de la medición de los metabolitos de los esteroides sexuales en las aves, determinar la relación entre las hormonas sexuales femeninas y masculinas, razón expresada por los estrógenos: andrógenos. Estas hormonas se utilizan como parámetro para la presentación del desarrollo y la maduración sexual. Si el resultado de esta relación tiene valores altos debido a la alta concentración de estrógeno y los niveles bajos de andrógenos, el pájaro se sexará como hembra. Si el resultado es bajo (la inversa de la primera) se sexará como macho<sup>24</sup>.

#### 4.3.5 **Sexaje por comportamiento.** Según Samour, “tradicionalmente, muchas especies en cautividad se han estado observando los patrones de conducta entre los individuos como el acicalamiento y la alimentación. En el caso de una pareja “verdadera” generalmente el macho acicala y alimenta a la hembra. Sin embargo si la pareja está formada por individuos del mismo sexo un individuo suele asumir el papel dominante, dando una impresión equivocada”<sup>25</sup>.

---

<sup>23</sup> Stell ., Gimenez y Sanches. La citogénica como herramienta en el sexaje de las aves. En: I congreso internacional de mejoramiento y aprovechamiento de fauna silvestre. Bogotá, agosto 25 – 27, 2005.

<sup>24</sup> ANTUNES, Eduardo. y ALVARENGA, Cláudio. Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais a partir de excretas cloacais. En: Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 2006. vol.43. p.

<sup>25</sup> Ibid., p. 127

### 4.3.7 Sexajes tradicionales.

**4.3.7.1 Tamaño del individuo.** Para Samour “según los criterios tradicionales, en estados de cautividad, las aves más pequeñas corresponderían a las hembras y los machos serían los individuos más grandes. Más sin embargo esto no ha sido algo certero ya que se han realizado confirmaciones con sexado quirúrgico y no coinciden con los supuestos”<sup>26</sup>.

**1.1.7 4.3.7.2 Sexaje pélvico.** Según Mitchehell y Tulli, “este consiste en la palpación de la distancia entre los huesos del pubis con el dedo índice”<sup>27</sup>. según Latermann “esta técnica las hembras tienen la distancia más amplia del pubis que los machos y como resultado de esta distancia, cuando una hembra y un macho están sentados normalmente los miembros posteriores del macho están menos separados que los de la hembra”<sup>28</sup>.

**4.3.8 Sexaje molecular.** Liza, Maturrano y Rosadio, afirman que:

El sexaje basado en el análisis de ADN (sexaje molecular) ha evolucionado rápida y positivamente en especies aviares, habiéndose empleado diferentes marcadores para establecer diferencias entre hembras y machos. Inicialmente, se buscó un marcador ligado al sexo para el ave *Parus major* mediante la técnica del RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN), donde se amplificaba una secuencia de ADN del cromosoma W. Esta técnica, sin embargo, amplificaba secuencias de ADN no codificante altamente variable que hacía de la técnica poco confiable, incluso en especies bien relacionadas. Posteriormente, informaciones de secuenciamiento de ADN en esta misma especie permitió encontrar un segmento similar al gen chd-1 (Cromo helicasa ADN) descrito previamente en ratones. Este gen homólogo, designado en aves como chd-W, fue inicialmente utilizado como un marcador molecular para sexaje de aves hembras<sup>29</sup>.

---

<sup>26</sup> Ibid., p. 128

<sup>27</sup> MITCHEHELL. y TULLY. Op cit., p. 253

<sup>28</sup> LATERMANN. Op cit., p. 58

<sup>29</sup> LIZA, Jaqueline., MATURRANO, Lenin. y ROSADIO, Raúl. Determinación del sexo por ADN en cinco especies de guacamayos. En: Revista de investigación veterinaria del Perú. Junio, 2008. vol.19, no.1. p.34

#### 4.3.8.1 Gen cromosoma helicasa ADN – CHD. Matta *et al*, contempla en su artículo que:

La prueba de sexaje molecular se basa en el análisis del gen cromosoma helicasa ADN (CHD), el cual hasta el momento ha sido uno de los pocos genes ligados tanto al cromosoma Z como al W. Este gen se encuentra muy conservado entre los diferentes órdenes evolutivos tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos y se ha demostrado que puede ser usado para la identificación del sexo en aves, con unas pocas excepciones como las ratites. Las tipificaciones basadas en este gen pueden darse por el corte diferencial con enzimas de restricción del producto amplificado, polimorfismo conformacional de banda única (SSCP), o diferencias en el tamaño del intrón amplificado.

Los mismos autores afirman que para la identificación y posterior amplificación del gen, se han empleado una serie de cebadores que se caracterizan por poseer una secuencia nucleotídica capaz de reconocer regiones exónicas conservadas, permitiendo de esta manera que se lleve a cabo la amplificación de un intrón, que es menos conservado. Esto permite observar diferencias de tamaño en los productos amplificados del gen CHD en los cromosomas W y Z, debido a que presentan longitudes diferentes en los intrones que son amplificados para la determinación del sexo. La copia de W siempre es más grande, haciendo pensar que en algunos casos ha ocurrido una delección en el cromosoma Z o una inserción en el cromosoma W. Por tal motivo, es factible detectar un producto de amplificación del fragmento del gen CHD representado por una banda única por electroforesis en el macho, ya que este es homogamético (ZZ) y los dos productos de amplificación provenientes de cada uno de estos cromosomas presentarán igual peso molecular; mientras que en las hembras se obtienen dos bandas de distinto tamaño correspondientes a los productos de las amplificaciones de los genes CHD-Z y CHD-W, lo que permite la asignación inequívoca de sexo en una muestra determinada<sup>30</sup>.

Según Jacqueline Liza *et al*,

En su investigación realizaron la amplificación del fragmento del gen chd mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores P2 (5´ TCTGCATCGCTAAATCCTTT 3´) y P8 (5´ CTCCCAAGGATGAGRAAAYTG 3´) con gran éxito<sup>31</sup>.

Los mismos autores afirman que, en este estudio, se pudo contar con individuos de sexo conocido para estandarizar la prueba en una primera etapa. A pesar que las

---

<sup>30</sup>. MATTA CAMACHO, Nubia, *et al*. Determinación de Sexo en Aves Mediante Herramientas Moleculares. En: Acta biológica Colombiana. 2009. vol. 14, no. 1. p. 25 – 38

<sup>31</sup> LIZA, Jacqueline., MATURRANO, Lenin. y ROSADIO, Raúl. Op.Cit., 34

muestras permanecieron conservadas en condiciones de refrigeración por cuatro meses, su posterior empleo no alteró la calidad del ADN de las aves, lo cual es importante si se trabajan muestras de especies en situación crítica o en peligro de extinción. Así mismo, se observó una concordancia del 100% entre los resultados de sexaje por pruebas moleculares y por métodos convencionales (sexaje quirúrgico e historia) en el grupo de aves de sexo previamente conocido<sup>32</sup>.

Fridolfsson y Ellegren, afirman que:

Con los cebadores 2550F/2718R se obtienen diferencias en un rango entre 150 a 250 pb; mientras que las diferencias en las secuencias obtenidas con los cebadores P2/P8 oscilan entre 10 y 80 pb. Esta pequeña diferencia de tamaño hace que estos dos productos sean fácilmente identificables por electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida. Este es un tipo de metodología simple, rápida comparado con otras técnicas moleculares y a su vez requiere cantidades muy pequeñas de DNA que pueden obtenerse de gotas de sangre o incluso de una pluma<sup>33</sup>.

**4.3.8.1.1 Importancia del uso de la PCR en el sexaje de aves.** Cerit y Avanus, afirman que:

Las técnicas de sexaje por ADN son más fiables que las otras. Estas técnicas ofrecen la ventaja de ser un método de determinación del sexo no invasiva. Hace una década los procedimientos de determinación del sexo por ADN requerían una gran muestra de sangre y varias semanas para su procesamiento. Hoy en día, las muestras pueden ser tan pequeñas como una sola pluma y los ensayos pueden ser completados en tan solo 24 horas sin afectar a la fiabilidad de la prueba<sup>34</sup>.

Nubia Matta *et al*, manifiestan que:

La utilización de metodologías basadas en la PCR y en el gen CHD facilitan la identificación inequívoca del sexo en aves, es una metodología útil para tipificar el sexo en especies pertenecientes a distintos órdenes con escaso o nulo dimorfismo sexual, de aplicabilidad para reconocer la proporción de sexos de una población cautiva y lograr establecer el número correspondiente a los pares de cría potenciales, convirtiéndose de esta manera en una ayuda en la implementación de

---

<sup>32</sup> Liza.....

<sup>33</sup> FRIDOLFSSON A. y ELLEGREN H. op cit, p.116-121

<sup>34</sup> CERIT, H. y AVANUS, K. Sex determination by CHDW and CHDZ Genes of Avian Sex Chromosomes in *Nymphicus hollandicus* Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.2007. vol.31. p. 371-374

programas de reproducción en los zoológicos o en especies amenazadas, en las que se planea implementar programas de conservación *ex situ* que implica la determinación inequívoca de sexo. Por otro lado la aplicación de estas metodologías resulta una herramienta muy útil para productores, explotaciones o estudios de heredabilidad de rasgos de importancia económica. Apoya sin duda la obtención de información para estudios de comportamiento, ecología y estructura de poblaciones de aves silvestres<sup>35</sup>.

Las metodologías que hacen uso del ADN son herramientas valiosas por su rapidez, sensibilidad y la posibilidad de toma de muestras como plumas, uñas o simples gotas de sangre que minimizan el dolor y el estrés en los procedimientos de toma de muestra.

#### **4.3.8.2 Metodologías que hacen uso de la hibridación del DNA**

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Los RFLP se definen como el polimorfismo observado en la longitud de los fragmentos obtenidos por el corte de la doble cadena de ADN. Esta metodología brinda la posibilidad de comparar los perfiles de bandas generados después de la digestión por enzimas de restricción de las moléculas de ADN de individuos diferentes. Las bandas son generadas por la hibridación de fragmentos de ADN con secuencias homólogas de ADN radiomarcadas. Los RFLPs permiten detectar las diferencias de sexo porque los cromosomas sexuales en este caso tienen patrones de asociación con la sonda radiactiva. Dentro de las limitaciones está su difícil automatización y la manipulación de material radiactivo para su visualización.

Minisatélites. Los minisatélites son regiones no codificantes del genoma de aproximadamente 100 pb que se encuentran organizadas en repeticiones en *tandem*. Generalmente estos sitios presentan un polimorfismo debido a la variación en el número de repeticiones; a esto se le conoce como número variable de repeticiones en *tandem* (VNTR). Se describieron y desarrollaron sondas de ADN que son capaces de descubrir números grandes de minisatélites y la hipervariabilidad de los sitios, por medio de la hibridación de los fragmentos de ADN digeridos y de su posterior electroforesis, donde se visualiza un patrón de bandas que es único para cada individuo.

---

<sup>35</sup> MATTA CAMACHO, Nubia, *et al.* Op. cit, p. 25 – 38

#### 4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para Carson, Miller y Witherow:

La reacción en cadena de la polimerasa fue desarrollada por Kary mullis en 1983. Esta ha simplificado muchos procesos en biología molecular y ha hecho posibles nuevas técnicas.

La PCR usa un proceso logarítmico para amplificar secuencias de ADN. La amplificación teórica de la plantilla de ADN, es de  $2^n$  donde n es el número de ciclos. Después de treinta ciclos de PCR a partir de una sola plantilla, puede ser sintetizado  $1 \times 10^9$  moléculas de nuevo ADN. Un típico programa de termociclado consiste en los siguientes pasos:

- Desnaturalización del ADN (94°C) 1 minuto;
- Alineamiento del cebador a la plantilla (basada en una temperatura de Fusión de los cebadores 60°C) 1minuto;
- Síntesis de ADN (72°C) 1minuto por kb a ser amplificada;
- Repetir pasos 1 – 3 treinta veces.

Los cebadores de ADN son cortos, son secuencias de cadenas complementarias a los extremos terminales de la región a ser amplificada. En otras palabras los dos cebadores deben flanquear una región de ADN, con un cebador alineado a la cadena sentido y el otro a la antisentido. Ambos cebadores son necesarios para que la amplificación exponencial ocurra.

La ADN polimerasa termoestable más comúnmente utilizada es la *taq* ADN polimerasa, aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, la cual fue descubierta creciendo en lagunas calientes a 75°C en el Parque Nacional de Yellowstone.

Los ingredientes necesarios para que la reacción en cadena de la polimerasa se lleve a cabo son:

- Molde de ADN
- Cebador
- Cebador reverso
- Nucleótidos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
- ADN polimerasa termoestable
- Buffer
- Magnesio (necesario para la actividad enzimática)<sup>36</sup>

---

<sup>36</sup> CASON, Susan., MILLER, Heather y WITHEROW, D. Scott. Molecular biology techniques a classroom laboratory manual. Tercera edición. Copyright 2012. p 21-23



GOMEZ *et al*, exponen que:

La PCR permite la síntesis específica y exponencial de una región determinada de ADN a partir de dos fragmentos de ADN específicamente diseñados, los cuales hacen parte de los extremos terminales de la molécula de ADN que se desea amplificar. Las reacciones de PCR generalmente son altamente específicas, especificidad dada por la hibridación correcta de las secuencias específicas de iniciadores complementarios a la región blanco que va a ser amplificada. La replicación continua, exponencial y semiconservativa, hace que a partir de una región específica de ADN utilizada como molde o plantilla de ADN, se produzcan cientos de copias de ADN nuevo sintéticamente producido.

Los iniciadores de la PCR incluyen secuencias de nucleótidos específicas, los cuales son diseñados para hibridar en cualquiera de las cadenas paralelas o antiparalelas de la región objetivo de ADN a amplificar. Dichas secuencias deben ser complementarias a los extremos terminales de la región de ADN. Una vez que hibridan los iniciadores a la cadena sencilla de ADN, proveen el estado de doble cadena a la molécula en el extremo 3' hidroxilo terminal requerido para la estabilización del ADN polimerasa termoestable, para empezar la síntesis de la nueva cadena de ADN (complementaria a la cadena a la cual el iniciador fue anillado). Sin embargo, debido a que el proceso de la PCR es necesario la utilización de dos iniciadores (uno diseñado para cada una de las cadenas de la molécula de ADN a ser amplificada) son requeridos diferentes ciclos repetitivos en la hibridación de los iniciadores (anillamiento), así como disociación de los mismos, de tal manera que sea posible la amplificación del ADN en dirección 5' a 3' en la hebra sentido o 3' a 5' en la hebra anti sentido; en otras palabras, los indicadores actúan tal como lo hacen los fragmentos de Okasaki durante el proceso de replicación natural del ADN.

El proceso de la PCR es un proceso cíclico, en el cual la muestra de ADN es inicialmente desnaturada con el fin de ser desenrollada y separada del estado de doble cadena a cadena sencilla. Lo anterior es posible gracias al calentamiento de la muestra en un ambiente acuoso, usualmente a una temperatura de 94°C de 30s a 5 min. La hibridación de los oligonucleótidos a cada una de las cadenas es alcanzada gracias a que la temperatura de la reacción es disminuida (temperatura de fusión  $T_m$  – por *temperature melting*) a un grado entre 40°C y 65°C (esta temperatura depende del diseño de los iniciadores y de las secuencias que lo componen). Después de la hibridación de los iniciadores, la temperatura es elevada a aproximadamente 72°C (una temperatura óptima para la ADN polimerasa termoestable utilizada durante la replicación); posteriormente todo el ciclo se repite y es predeterminado a número de veces. Después de cada ciclo de replicación, cada molécula de ADN de doble cadena es producida; esta molécula producida se conoce como amplicón, el cual contiene secuencias terminales complementarias a las secuencias de los iniciadores utilizados. Este proceso permite que cada amplicón sirva como molde del siguiente paso de replicación en el proceso de la

PCR de manera, lo que resulta en una amplificación exponencial de un número de moléculas blanco durante cada ciclo. El requerimiento final para probar la efectividad de la técnica fue la implementación del termociclador, que remplazo los lavados y cambios de temperatura manuales<sup>37</sup>.

---

<sup>37</sup> GOMEZ, Jorge, *et al.* Biología molecular principios y aplicaciones. Medellín. 2011. p. 331 – 345.

## 5. DISEÑO METODOLÓGICO

### 5.1 LOCALIZACIÓN

Los animales incluidos en este proyecto, se encuentran en El Centro de Rehabilitación de Fauna Silvestre del Oriente de Caldas (CRFSOC), localizado en el municipio de Victoria, departamento de Caldas de la República de Colombia, con una ubicación astronómica de 05°19 Norte 74°54 Oeste <sup>38</sup>, una altura de 750 msnm, temperatura media anual de 26 °C<sup>39</sup>.

Para realizar el sexaje por ADN, las muestras de sangre tomadas a los animales fueron enviadas al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia - IGUN en la ciudad de Bogotá D.C, de la República de Colombia.

### 5.2 MUESTRA

Los individuos estudiados provinieron de incautaciones realizadas por la autoridad ambiental de Caldas y la policía ambiental.

De la población de *A. ochrocephala* presente en el CRFSOC, se tomó una muestra de 44 individuos. Los animales seleccionados fueron adultos. No se incluyeron en el proyecto animales con anomalías físicas o alteraciones de salud evidentes.

Los animales se encuentran en encierros ubicados al interior del bosque, en estos se encuentran perchas colocadas en diferentes direcciones y comederos que garantizan el bienestar de los animales cautivos. La alimentación se realiza una vez al día, por la mañana, la cual es a base de frutas como banano, mango, papaya y semillas de girasol.

Para determinar el tamaño de la muestra fue necesario realizar una prueba piloto la cual se llevó a cabo en el Centro de Atención y Valoración de Fauna Silvestre de la Corporación Regional del Valle del Cauca.

---

<sup>38</sup> GEOHAK VICTORIA. Disponible en internet: < [http://toolserver.org/~geohack/geohack.php?pagename=Victoria\\_\(Caldas\)&language=es&params=05\\_19\\_\\_N\\_74\\_54\\_\\_W\\_type:city.](http://toolserver.org/~geohack/geohack.php?pagename=Victoria_(Caldas)&language=es&params=05_19__N_74_54__W_type:city.) >

<sup>39</sup> SITIO OFICIAL DE VICTORIA EN CALDAS. Disponible en internet: < <http://victoria-caldas.gov.co/index.shtml>>

Para esto se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{e^2}$$

Donde:

$z$  = Factor de confiabilidad

$\sigma^2 = s^2$

$e$  = margen de error máximo

Por lo tanto según los datos obtenidos en la prueba piloto tenemos que:

- $\bar{x} = 0.631$
  - $s = 0.107$
  - $e = 0.05 \cdot \bar{x} \quad e = 0.05 \cdot 0.631 = 0.03155$
  - $Z = 1.96$
- $$n = \frac{1.96 \cdot 0.107}{0.03155} = 44.185$$

Según los anteriores cálculos el número de animales a muestrear es de 44.

### 5.3 VARIABLES

- Clasificación del sexo por sexaje pélvico
- Clasificación del sexo por ADN
- Medida de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis

### 5.4 PROCEDIMIENTO

Los animales seleccionados para el proyecto fueron separados un día antes del procedimiento, se llevaron de los encierros R2 y R3 al encierro R6, garantizando así el ayuno de los ejemplares. Para esto fue necesario utilizar herramientas de restricción física como nasas y guantes de carnaza, las cuales facilitaron la captura de los mismos. Cada día se tomaron 11 ejemplares los cuales fueron introducidos en guacales para ser transportados al encierro R6 donde se soltaron, como se aprecia en la figura 3.

Como parámetro para establecer el estado de salud de los individuos, se determinó la condición corporal según lo recomendado por Varela<sup>40</sup>.

Un día después de llevar los animales al encierro R6, fueron transportados uno a uno al consultorio veterinario del CRFSOC en una bolsa de tela la cual disminuyó el nivel de estrés y permitió realizar una mejor manipulación del animal y un buen pesaje.

Para sacar el animal de la bolsa, se sujetó por la parte de afuera la cabeza, para poder asegurarla en el momento de sacar el individuo, garantizando así la integridad del personal que lo manipula. Este procedimiento puede apreciarse en la figura 4. En la Tabla 1 se indica la identificación de cada ejemplar con el peso y condición corporal.

Figura 3. Restricción física y transporte de animales.



5.4.1 **Sexaje pélvico.** La medición de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis se hizo en dos fases, la primera con el animal consciente y la segunda con el individuo anestesiado, esto con el fin de evaluar si la tensión causada en el animal por la restricción física causa alguna alteración en la medida a evaluar:

Para la primera se restringió físicamente al animal. Uno de los ayudantes, con una mano sujetó la cabeza del individuo y con la otra las patas y las alas, lo colocó

<sup>40</sup> ROMAGNANO, A. Examination and Preventive Medicine Protocols in Psittacines. Citado por. VARELA, et al. Rehabilitación de fauna Silvestre. Bogotá, 2005. p. 53

posteriormente en decúbito dorsal sobre la mesa del consultorio; al tenerlo inmobilizado, se le tapó los ojos con una bolsa, para disminuirle el estrés; al mismo tiempo otro ayudante procedió a coger una de las patas y humedecer la zona púbica con clorexidina (Clorexidin®) , para facilitar la visualización de los huesos y la toma de la medida de la distancia de los extremos de los huesos del pubis con el Calibrador Vernier (Discover ®), tal como se observa en la figura 5. En la Tabla 2 se muestran las medidas de cada individuo al igual que su respectivo sexo según la técnica de sexaje pélvico. En este proyecto se identificó como machos a individuos que presentaron medidas menores a un centímetro y como hembras a ejemplares con medidas mayores a un centímetro; para mejorar el análisis estadístico se le asignó el código 1 (uno) a los machos y el código 2 (dos) a las hembras.

Figura 4. Pesaje y manejo del animal



Figura 5. Toma de la medida de la distancia de los extremos de los huesos del pubis con el animal sin anestesia.



Tabla 1. Identificación, peso y condición corporal de los individuos *Amazona ochrocephala* estudiados.

Nº de microchip	Peso gr	Condición corporal 1 - 5	Nº de microchip	Peso gr	Condición Corporal 1 - 5
590518	440	3	889921	400	4
591460	430	4	890239	440	4
591943	350	4	891842	380	4
592278	400	3	891883	370	4
593375	410	3	892265	450	3
593465	340	3	892374	340	4
594287	420	3	895239	370	4
596231	400	4	895252	350	4
596862	390	4	896104	350	3
599124	440	3	896367	410	3
860352	380	3	896488	340	3
869469	400	4	896898	400	4
873857	430	3	897029	470	4
875280	490	3	897585	420	4
878297	360	3	897708	320	4
888958	400	4	897965	440	3
888975	410	4	898100	380	3
889022	400	4	898452	400	3
889099	390	3	898809	360	3
889246	370	3	898933	380	3
889350	330	4	899540	360	4
889468	450	3	899740	340	3

Tabla 2. Medida de la distancia de los extremos de los huesos del pubis y sexaje pélvico de los individuos *Amazona ochrocephala* obtenidas con los animal conscientes.

Nº de microchip	Medida de la distancia de los huesos del pubis – animal consciente (cm)	Sexaje pélvico	Nº de microchip	Medida de la distancia de los huesos del pubis – animal anestesiado (cm)	Sexaje pélvico
590518	1,15	2	889921	0,7	1
591460	1,425	2	890239	0,465	1
591943	0,47	1	891842	0,53	1
592278	0,43	1	891883	0,5	1
593375	0,57	1	892265	0,62	1
593465	0,66	1	892374	1,07	2
594287	1,04	2	895239	0,81	1

Tabla 2. (Continuación)

Nº de microchip	Medida de la distancia de los huesos del pubis – animal consciente (cm)	Sexaje pélvico	Nº de microchip	Medida de la distancia de los huesos del pubis – animal anestesiado (cm)	Sexaje pélvico
596231	0,41	1	895252	0,76	1
596862	0,6	1	896104	0,44	1
599124	1,04	2	896367	0,515	1
860352	0,77	1	896488	0,3	1
869469	1,05	2	896898	0,66	1
873857	0,22	1	897029	1,1	2
875280	1,63	2	897585	1	2
878297	0,86	1	897708	0,15	1
888958	0,36	1	897965	0,8	1
888975	0,87	1	898100	0,7	1
889022	0,74	1	898452	1	2
889099	0,43	1	898809	1,245	2
889246	0,74	1	898933	1,1	2
889350	0,2	1	899540	0,445	1
889468	1,38	2	899740	0,7	1

Para el segundo procedimiento se aplicó el protocolo de anestesia según Carpenter, que consistió en la administración de 15 mg/kg de ketamina 10% (Ciruphar®) IM. Combinado con 1 mg/kg de diazepam (10mg/2ml) o midazolam (Midavet®)<sup>41</sup> en el musculo pectoral. A los 5 minutos después de la administración, este protocolo brindó un estadio de anestesia 3, además proporcionó una buena relajación muscular. Al tener el animal anestesiado, se colocó en decúbito dorsal sobre la mesa del consultorio y se tomó la medidas la distancia entre los extremos de los huesos del pubis con un Calibrador Vernier, tal como se indica en la figura 6. En la Tabla 3 se muestran las medidas al igual que el respectivo sexaje pélvico.

Para aprovechar la restricción química de los animales, a cada uno, se le realizó un examen clínico general; a la mayoría de los individuos se les extrajo las plumas cortadas, con el fin de asegurar que nuevas crezcan y el proceso de rehabilitación sea más rápido, como se aprecia en la figura 7.

<sup>41</sup> CARPENTER, James. Exotic animal formulary. 2 ed. Philadelphia, Pensilvania. COPYRIGHT. 2001. p. 157



Figura 6. Toma de medida de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis con un Calibrador Vernier, con el animal anestesiado.



Tabla 3. Medida de la distancia de los extremos de los huesos del pubis y sexaje pélvico de los individuos *Amazona ochrocephala* obtenidas con los animal anestesiados.

Nº de microchip	Medida de la distancia de los huesos del pubis -animal consciente (cm)	Sexaje pélvico	Nº de microchip	Medida de la distancia de los huesos del pubis – animal anestesiado (cm)	Sexaje pélvico
590518	1,2	2	889921	0,88	1
591460	1,435	2	890239	0,55	1
591943	0,465	1	891842	0,56	1
592278	0,44	1	891883	0,44	1
593375	0,7	1	892265	0,625	1
593465	0,55	1	892374	1	2
594287	1,2	2	895239	0,75	1
596231	0,575	1	895252	0,62	1
596862	0,5	1	896104	0,58	1
599124	1,11	2	896367	0,45	1
860352	0,5	1	896488	0,44	1
869469	1,055	2	896898	0,62	1
873857	0,37	1	897029	1,23	2
875280	1,575	2	897585	1,1	2
878297	0,97	1	897708	0,14	1
888958	0,3	1	897965	0,9	1
888975	0,8	1	898100	0,71	1
889022	0,81	1	898452	1,1	2
889099	0,47	1	898809	1,245	2
889246	0,7	1	898933	1,16	2
889350	0,12	1	899540	0,53	1
889468	1,435	2	899740	0,7	1

Figura 7. Extracción de plumas



**5.4.2 Toma de muestras de sangre.** La extracción de sangre se realizó según lo recomendado por Orjuela<sup>42</sup>, mediante la punción de la vena ulnar extrayendo 0.1 – 0.2 ml de sangre. La muestra se depositó en un tubo con etanol al 10% el cual conserva el ADN al inactivar la acción de las DNAsas. Todos los tubos fueron debidamente rotulados con el número de microchip del individuo muestreado como se aprecia en la figura 8. Todas las muestras se refrigeraron a 4°C.

Figura 8. Toma de muestra de sangre mediante punción de la vena ulnar

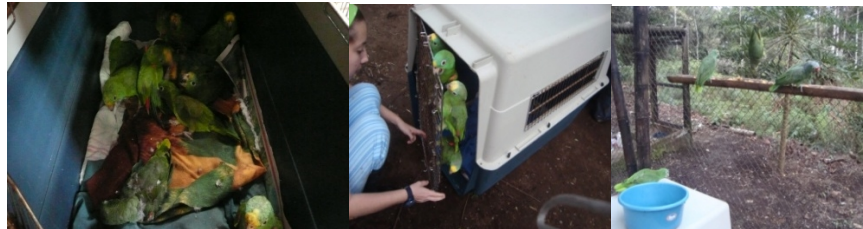


---

<sup>42</sup> ORJUELA, Delio. Introducción a la medicina de fauna silvestre en latinoamérica. Serrano, 2009. p 151.

Para el periodo de recuperación los animales fueron colocados en un ambiente calmado, seguro y bien ventilado, donde permanecieron en observación hasta que se incorporaron por sí mismos, como se percibe en la figura 9.

Figura 9. Recuperación de la anestesia de los individuos.



**5.4.3 Determinación del sexo por ADN.** Las muestras fueron transportadas en una cava con gel refrigerante, al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia - IGUN en Bogotá D.C., donde se realizó el sexaje de cada uno de los individuos muestreados a través de marcadores moleculares aplicando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa - PCR, como se aprecia en la figura 10.

Las muestras fueron ordenadas de acuerdo al número de microchip de cada individuo de menor a mayor, asignándoles un número del 1 – 44 para facilitar el procesamiento de las muestras en el laboratorio.

Las muestras de sangre total primero se procesaron mediante el protocolo de extracción de ADN usando Tiocianato de Guanidino (GuSCN) y Dióxido de Silicio según HOYOS M *et al*<sup>43</sup>, sin embargo con este, no se pudo obtener una buena amplificación. Por lo que se empleó el protocolo de extracción fenol/cloroformo.

Para la PCR se utilizaron los cebadores 2550F(5'-GTTACTGATTCGTC-TACGAGA-3') y 2718R(5'-ATTGAAATGATC-CAGTGCTTG-3) los que delimitan las regiones exónicas conservadas del gen CHD permitiendo la amplificación de un intrón que difiere de tamaño entre los cromosomas W y Z usando protocolos modificados de Griffiths R. *et al.* (1998)<sup>44</sup> y Fridolfsson & Ellegren (1999)<sup>45</sup>.

<sup>43</sup> HOYOS, M., TUSSO, S., MANRIQUE, A. y BLOOR, P. (En Prensa) Protocolos sencillos y económicos para la purificación de ADN a partir de Bacterias Gram-negativas, geles de Agarosa y diferentes tejidos animales; usando Tiocianato de Guanidino (GuSCN) y Dióxido de Silicio.

<sup>44</sup> GRIFFITHS R DOUBLE MC, ORR K, DAWSON RJ: A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*. 1998;7:1071-1075. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd Edition Cold Spring. 1989.

<sup>45</sup> FRIDOLFSSON A. y ELLEGREN H. *op cit.*, p.116-121.

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 3.5%. La asignación del sexo se realizó por la presencia de dos bandas en las hembras o en los machos por la presencia de una sola. Como se aprecia en la figura 11. El sexo de cada individuo se puede apreciar en la tabla 4. Para mayor información sobre protocolos de extracción y amplificación dirigirse al Anexo A.

Figura 10. Realización del sexaje molecular



Figura 11. Visualización de bandas de amplificación visible en la electroforesis del gel de agarosa.

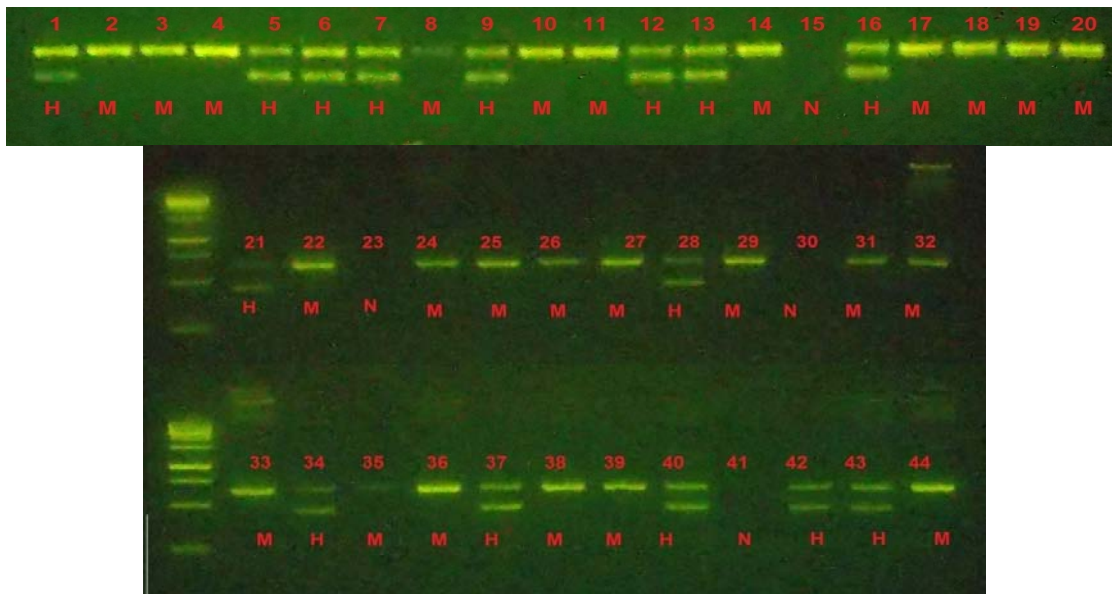


Tabla 4. Sexo de los individuos determinado por técnica molecular.

<b>Nº signado por el laboratorio</b>	<b>Nº de microchip</b>	<b>Sexaje por ADN</b>	<b>Nº asignado por el laboratorio</b>	<b>Nº de microchip</b>	<b>Sexaje por ADN</b>
1	590518	2	23	889921	N*
2	591460	1	24	890239	1
3	591943	1	25	891842	1
4	592278	1	26	891883	1
5	593375	2	27	892265	1
6	593465	2	28	892374	2
7	594287	2	29	895239	1
8	596231	1	30	895252	N*
9	596862	2	31	896104	1
10	599124	1	32	896367	1
11	860352	1	33	896488	1
12	869469	2	34	896898	2
13	873857	2	35	897029	1
14	875280	1	36	897585	1
15	878297	N	37	897708	2
16	888958	2	38	897965	1
17	888975	1	39	898100	1
18	889022	1	40	898452	2
19	889099	1	41	898809	N*
20	889246	1	42	898933	2
21	889350	2	43	899540	2
22	889468	1	44	899740	1

\*individuos no sexados molecularmente

Como se observa en la tabla 4, hubo cuatro individuos clasificados con la letra N a los cuales no se les pudo determinar el sexo molecularmente, posiblemente porque la cantidad de sangre fue superior a la recomendada por el laboratorio, 0.2ml, no permitiendo así la conservación del ADN, ya que el etanol no fue suficiente para inactivar la acción de las DNAsas. Por esta razón las muestras fueron retiradas para el análisis estadístico que involucró conocer el sexo por ADN.

## 5.5 PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos se procesaron utilizando el paquete estadísticos SPSS versión 17<sup>46</sup>.

**5.5.1 plan de análisis de datos.** Para analizar las medidas de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis en individuos *Amazona ochrocephala*, se trabajó con medidas de tendencia central y variabilidad, como son la media, varianza, mínimo y máximo valor, con un intervalo de confianza al 95%.

Para comparar el sexaje pélvico con los resultados del sexaje por ADN, se utilizó el índice de concordancia de Kappa. Ya que según Bautista y Tamayo<sup>47</sup> éste permite medir la extensión en que los resultados producidos por dos técnicas diferentes son iguales entre sí, es decir, establece el grado de comparación entre dos pruebas y así determina si producen resultados lo suficientemente comparables que los haga intercambiables.

Los mismos autores<sup>48</sup> afirman que:

el **Kappa** está definido por:

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Donde: Po es la proporción observada de concordancia y Pe es la proporción esperada de concordancia debida al azar, definidos por:

$$Po = \frac{(a+d)}{N}$$

$$Pe = \frac{(r1c1 + r2c2)}{(N * N)}$$

El valor del índice kappa es 0 si la proporción observada de concordancia es igual a la proporción esperada de concordancia debida al azar. 1 si la concordancia esperada es perfecta. Menor de 0 si la concordancia observada es menor que la concordancia esperada debida al azar.

---

<sup>46</sup>IBM. Disponible en internet: <<http://www-01.ibm.com/software/es/analytics/spss/>>

<sup>47</sup> BAUTISTA, G. y TAMAYO, M. Evaluación de pruebas diagnosticas. Estudios de concordancia. En: Investigación, teoría y método. p. 74 – 78.

<sup>48</sup> Ibid.p. 74 – 78.

Para su valoración Landis y Koch<sup>49</sup> propusieron la siguiente escala:

**Valor de k Magnitud de  
la concordancia**

Menor de 0 Pobre  
0-0.20 Escasa  
0.21-0.40 Leve  
0.41-0.60 Moderada  
0.61-0.80 Sustancial  
0.81-1.00 Casi perfecta

---

<sup>49</sup> LANDIS J. y KOCH G. (1977).The measurement of observer agreement for categorical data. Citado por CORTÉS Édgar ., RUBIO Jorge. y Gaitán Hernando. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. En: Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2010. vol. 61, no. 3. p 247-255

## 6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 6.1 OBTENCIÓN DE LAS MEDIDAS DE LA DISTANCIA ENTRE LOS EXTREMOS DE LOS HUESOS DEL PUBIS EN INDIVIDUOS *Amazona ochrocephala*.

La medida de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis, se tomó tanto con los individuos consientes como anestesiados, para así, observar el impacto que tuvo la restricción física sobre los valores obtenidos. Ya que como lo anuncia Orjuela<sup>50</sup> la captura manual, produce tensión en el animal manipulado.

Con un 95% de confianza, en este estudio se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medidas obtenidas con los animales conscientes y anestesiados, donde los intervalos de confianza fueron de (0.63,0.84) y (0.57,0.87) respectivamente.

Lo cual permite inferir que la restricción no alteró significativamente las medidas de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis.

### 6.2 COMPARACIÓN DEL SEXAJE PÉLVICO CON LOS RESULTADOS DEL SEXAJE POR ADN EN LOS ANIMALES ESTUDIADOS

Para comparar los resultados obtenidos por el sexaje pélvico y los del sexaje por ADN, se calculó el índice de concordancia de *Kappa* (*k*) con los 40 de los 44 individuos muestreados, debido a que cuatro animales no pudieron ser sexados por ADN.

Para realizar el cálculo del valor del índice de kappa fue necesario agrupar los datos tal como se aprecia en la tabla 5.

---

<sup>50</sup> ORJUELA, Delio. Introducción a la medicina de fauna silvestre en latinoamérica. Serrano, 2009. p 151.



Tabla 5. Concordancia observada sexaje pélvico y sexaje por ADN

		Sexaje por ADN		Total
		macho	Hembra	
Sexaje pélvico	Macho	19	9	28
	Hembra	6	6	12
Total		25	15	40

Donde:

- 19 fueron los animales, clasificados como machos tanto en la prueba de sexaje por ADN como en la de sexaje pélvico.
- 6 fueron los animales, clasificadas como hembras tanto en la prueba de sexaje por ADN como en la de sexaje pélvico.
- 9 fueron los animales, clasificados como machos en el sexaje pélvico siendo hembras por medio de sexaje por ADN.
- 6 fueron los animales, clasificados como hembras con la prueba de sexaje pélvico siendo machos con la prueba de sexaje por ADN.
- 28 fueron los animales clasificados como machos en la técnica de sexaje pélvico.
- 25 son los individuos clasificados como machos en la técnica de sexaje por ADN
- 12 son los individuos clasificados como hembras en la técnica de sexaje pélvico
- 15 son los individuos clasificados como hembras en la técnica de sexaje por ADN

El valor del índice de kappa fue de 16.7 % del acuerdo máximo y 83.3% del debido al azar. Que según la escala de valoración de k de Landis y Koch<sup>51</sup> este valor muestra un grado de acuerdo escaso. Esto permite inferir que la técnica de sexaje pélvico, en este estudio, no produjo resultados lo suficientemente comparables e intercambiables con la técnica de sexaje molecular, la cual se utilizó como prueba

---

<sup>51</sup> LANDIS J. y KOCH G. (1977).The measurement of observer agreement for categorical data. Citado por CORTÉS Édgar ., RUBIO Jorge. y Gaitán Hernando. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. En: Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2010. vol. 61, no. 3. p 247-255

de oro, ya que como lo mencionan Matta *et al*<sup>52</sup>, la utilización del PCR y en el gen CHD facilitan la identificación inequívoca del sexo en aves con escaso o nulo dimorfismo sexual.

Dado que los animales objeto de estudio provinieron de decomisos, la información de sus antecedentes es generalmente escasa o nula y por ende se desconoce los ambientes experimentados por ellos en las diferentes etapas de su desarrollo. Por lo tanto se debe tener en cuenta que, como lo afirman Griffiths *et al*<sup>53</sup>, conforme un organismo va transformándose de un estado a otro durante el desarrollo, sus genes interaccionan en cada momento de su historia vital con su medio ambiente para producir un determinado fenotipo.

Todo esto conlleva a pensar que las medidas se pudieron ver afectadas por diversos factores entre los cuales podemos mencionar:

- Diferente procedencia geográfica de los individuos estudiados: Los loros *Amazona ochrocephala*, tienen una amplia distribución geográfica en nuestro país. En este trabajo, las medidas de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis pudieron verse afectadas por las diferentes procedencias de los animales. Tal como lo menciona Svensson<sup>54</sup>, la biometría en una especie puede cambiar a lo largo de su área de distribución, lo que dificulta la comparación de datos morfológicos obtenidos en distintas poblaciones. Dada la ausencia de información previa sobre la morfometría y diferenciación del sexo en individuos de la especie *Amazona ochrocephala*, no fue posible la comparación con otros estudios. Sin embargo investigaciones como las de Campos *et al*<sup>55</sup>, evidencian las variaciones morfométricas en poblaciones de la misma especie de aves ubicadas en diferentes zonas geográficas.

- Enfermedades y mal manejo nutricional, secuelas del tráfico ilegal: los ejemplares estudiados muy seguramente estuvieron sometidos a sistemas de crianza no propios de la especie, pudiendo afectar esto, en el desarrollo físico normal de los individuos. Como lo anuncia Werther<sup>56</sup> una de las consecuencias de una inadecuada nutrición ofrecida en cautiverio por las personas, generan

---

<sup>52</sup> MATTA CAMACHO, Nubia, *et al*. Op. cit, p. 25 – 38

<sup>53</sup> Grifits eta ll. Genetica. Novena edición. MacGrawhill. España 2008. p. 841.

<sup>54</sup> SVENSSON, L. Guía para la identificación de los Paseriformes europeos. Citado por CAMPOS, Francisco, *et al*. Un nuevo criterio para sexar mirlos acuáticos *Cinclus cinclus* en la península ibérica. En: Revista Catalana de Ornitología. 2005. vol 21. p. 44

<sup>55</sup> CAMPOS, Francisco, *et al*. Un nuevo criterio para sexar mirlos acuáticos *Cinclus cinclus* en la península ibérica. En: Revista Catalana de Ornitología. 2005. vol 21. p. 44

<sup>56</sup> WERTHER, K. Noninfectious diseases. Citado por FOWLER, M. y CUBAS, Z. En: Biology, medicine and surgery of sout american wild animals.lowa. Iowa State University, 2001. p.168

diferentes enfermedades en las aves, tales como: la enfermedad metabólica ósea, en la cual se presentan deformidades óseas; igualmente se puede presentar síndrome de mal crecimiento, el cual afecta el desarrollo normal del sistema óseo. A pesar de haber tenido cuidado con la selección de los individuos incluidos en este estudio, puede que los animales hayan sufrido alteraciones del crecimiento antes de entrar al centro de rehabilitación. Por lo que las medidas pudieron verse afectadas.

Via y Lane<sup>57</sup> definen la plasticidad fenotípica como la extensión en la cual el medio ambiente modifica al fenotipo. Por lo cual se puede inferir que la morfología y el crecimiento de los individuos evaluados en este estudio, se pudieron ver afectados por condiciones ambientales. En este sentido, es esperable que las medidas y resultado de este trabajo no reflejen la objetividad del sexaje pélvico, lo cual hace necesarias nuevas investigaciones con el fin de observar patrones morfológicos de esta especie tanto *in situ* como *ex situ*.

### **6.3 ESTABLECIMIENTO DE LOS RANGOS DE MEDIDAS DE LA DISTANCIA DE LOS HUESOS DEL PUBIS PARA HEMBRAS Y MACHOS DE LA ESPECIE *Amazona ochrocephala*.**

Al confrontar las medidas de las distancias de los huesos del pubis con la técnica de sexaje por ADN se obtuvo que:

Las medidas de los 25 machos se encontraron entre un mínimo de 0.3 cm y un máximo de 1.630 cm para los animales consientes; un valor mínimo de 0.4 cm y un máximo de 1.575 cm para individuos anestesiados; la media calculada en animales consientes y anestesiados fue de 0.752 cm y 0.774 cm respectivamente.

Las medidas de las 15 hembras se encontraban entre un mínimo de 0,150 cm y un máximo de 1,150 cm para los animales consientes; un valor mínimo de 0,120 cm y un máximo de 1.20 cm para los individuos anestesiados; la media calculada en animales consientes y anestesiados fue de 0.685 cm y 0.703 cm respectivamente.

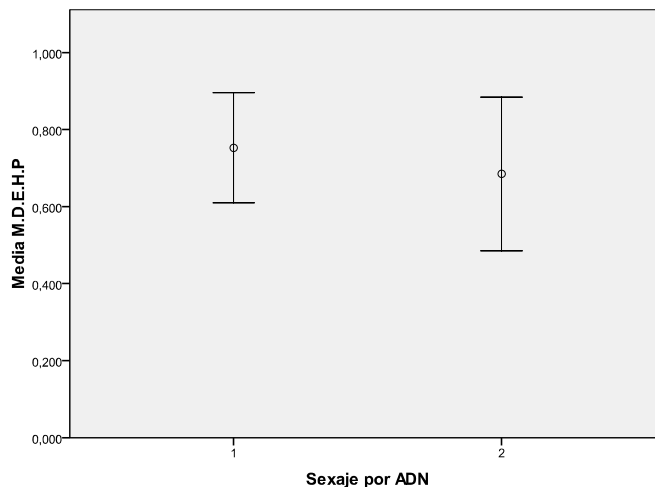
---

<sup>57</sup> Via S, Lane R. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution*. 1985;39:505.

Como se observa, los machos presentaron un media mayor que la de las hembras, sin embargo con un 95% de confianza, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medidas de la distancia de los huesos del pubis entre machos y hembras, porque los intervalos de confianza estuvieron entre (0.62,0.89) para los machos y (0.48,0.87) para las hembras, lo que indica que los datos se traslapan como se evidencia en la figura 12. Por esto los rangos de medidas no pudieron ser establecidos.

La técnica de sexaje pélvico sustenta que las hembras tienen una distancia entre los extremos del pubis más amplia que los machos. Sin embargo en este estudio, se encontró que las hembras tuvieron una distancia menor que la de los machos. Una causa de esto pudo ser la ovoposición escasa o nula observada en los encierros de las loras en el Centro de rehabilitación. Ya que como lo afirma Kim Joyner<sup>58</sup> la distancia entre los extremos de los huesos del pubis aumenta después de la ovoposición pero puede reducirse considerablemente en los meses siguientes a esta. Lo cual permite inferir que la baja ovoposición pudo ser otro de los factores que influyo en las medidas y resultados obtenidos en esta investigación. A pesar de esto los mismos autores<sup>59</sup> afirman que esta es una técnica poco fiable.

Figura 12. Gráfico de barras de error simple, entre la media de la medida de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis y sexaje por ADN.



\*M.D.E.H.P: medida de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis

<sup>58</sup> Joyner, Kim. Theriogenology. En: Avian medicine: Principles and application. 1994 , Wingers Publishing. p.780.

<sup>59</sup> Ibid. p.780.

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1 CONCLUSIONES

- Las medidas de las distancias de los huesos del pubis tomadas con el animal consciente y el animal anestesiado no mostraron diferencias estadísticamente significativas, lo cual implica que la restricción física con el animal consciente no alteró la medida de las distancia de los huesos del pubis.
- En este estudio, los resultados contradicen la técnica de sexaje pélvico en loros *Amazona ochrocephala*, ya que no fueron lo suficientemente comparables e intercambiables con la técnica de sexaje molecular. Sin embargo es de resaltar que la morfología y el crecimiento de los individuos evaluados, se pudieron ver afectados por la plasticidad fenotípica. Lo que no permitió determinar la validez de este tipo de sexaje.
- Las medidas obtenidas en este estudio, mostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medida de la distancia de los huesos del pubis de machos y hembras de la especie *Amazona ochrocephala*.
- La nula ovoposición observada en loras *Amazona ochrocephala* en el centro de rehabilitación, pudo influenciar en que los machos estudiados tuvieran un mayor valor que las hembras, en la media de la medida de la distancia entre los extremos de los huesos del pubis.

### 7.2 RECOMENDACIONES

- Utilizar de forma precavida la técnica de sexaje pélvico en *Amazona ochrocephala*, Por lo menos hasta que se obtengan datos que validen su veracidad.

- Realizar estudios de sexaje pélvico teniendo en cuenta la distribución geográfica de la especie *Amazona ochrocephala*.
- Llevar a cabo estudios en morfometría de *Amazona ochrocephala*, *in situ* y *ex situ* para obtener medidas que ayuden a la identificación del sexo en ésta especie.
- Realizar la técnica de sexaje molecular, cuando se cuente con los recursos necesarios en los centros de rehabilitación de fauna silvestre.
- Utilizar el protocolo anestésico de 15mg/kg de ketamina, con 1mg de diasepam o 1 mg de midazolam, en procedimientos que requieran una buena relajación muscular y analgesia por aproximadamente 20 minutos.

## BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR H. Algunas notas sobre el loro real *Amazona ochrocephala* (Psittacidae: psittacinae: arini) en Venezuela [en línea]. Revista de ecología latinoamericana. 2001. vol. 08, no. 1. p.19. [citado el marzo 23, 2011]. Disponible en internet: <<http://www.ciens.ula.ve/~cires/recol-v8n1a03.pdf> .>

ANTUNES, Eduardo. y ALVARENGA, Cláudio. Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais a partir de excretas cloacais. En: Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 2006. vol.43. p.

BAUTISTA, G. y TAMAYO, M. Evaluación de pruebas diagnosticas. Estudios de concordancia. En: Investigación, teoría y método. p. 74 – 78.

BirdLife International 2009. *Amazona ochrocephala*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. consultada el 19 enero 2011.

CAMPOS, Francisco, *et al.* Un nuevo criterio para sexar mirlos acuáticos *Cinclus cinclus* en la península ibérica. En: Revista Catalana de Ornitología. 2005. vol 21. p. 44

CARPENTER, James. Exotic animal formulary. 2 ed. Philadelphia, Pensilvania. COPYRIGHT. 2001. p. 157

CASON, Susan., MILLER, Heather y WITHEROW, D. Scott. Molecular biology techniques a classroom laboratory manual. Tercera edicion. Copyright 2012. p 21-23

CERIT, H. y AVANUS, K. Sex determination by CHDW and CHDZ Genes of Avian Sex Chromosomes in *Nymphicus hollandicus* Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.2007. vol.31. p. 371-374

CITES especies data base. <http://www.cites.org/eng/resources/species.html>. citada en 19 de enero 2011

Collar NJ, Juniper AT. Diminsions and causes of the parrot conservation crisis, international council of bird preservation. Tech publ 1991. Citado por, Stell C,

Jimenez LM y Sanches CA en el artículo LA CITOGNETICA COMO HERRAMIENTA EN EL SEXAJE DE LAS AVES. I Congreso internacional de Medicina y Aprovechamiento de fauna Silvestre Neotropical. Agosto 25 – 27, 2005. Bogota Colombia.

FRIDOLFSSON A y ELLEGREN H. A simple and universal method for molecular sexing of non –ratite birds. En: Journal of Avian Biology. Marzo, 1999. vol. 30, no. 1. p.116-121.

GOMEZ CELY Milena. Estadísticas del uso ilegal de fauna silvestre en Colombia, Ministerio del Medio Ambiente Dirección General de Ecosistemas Grupo de Biodiversidad, 2002.

GOMEZ, Jorge, *et al.* Biología molecular principios y aplicaciones. Medellín. 2011. p. 331 – 345.

GEOHAK VICTORIA. Disponible en internet: <[http://toolserver.org/~geohack/geohack.php?pagename=Victoria\\_\(Caldas\)&language=es&params=05\\_19\\_\\_N\\_74\\_54\\_\\_W\\_type:city](http://toolserver.org/~geohack/geohack.php?pagename=Victoria_(Caldas)&language=es&params=05_19__N_74_54__W_type:city)>

GRIFFITHS R DOUBLE MC, ORR K, DAWSON RJ: A DNA test to sex most birds. Molecular Ecology. 1998;7:1071-1075. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd Edition Cold Spring. 1989. Harbour Laboratory Press, New York.

Grifits eta II. Genetica. Novena edición. MacGrawhill. España 2008. p. 841.

Hillis, D., Moritz, C & Mable, B. (Eds). 1996. Molecular Systematics. Second Edition. Sinauer Associates Inc. USA. p. 342 - 343

HILTY, Steven. y BROWN, William. En: A guide to the birds of Colombia. Copyright. 2001. p. 262

HOYOS, M., TUSSO, S., MANRIQUE, A. y BLOOR, P. (En Prensa) Protocolos sencillos y económicos para la purificación de ADN a partir de Bacterias Gram-negativas, geles de Agarosa y diferentes tejidos animales; usando Tiocianato de Guanidino (GuSCN) y Dióxido de Silicio.

IBM. Disponible en internet: <<http://www-01.ibm.com/software/es/analytics/spss/>>

Joyner, Kim. Theriogenology. En: Avian medicine: Principles and application. 1994 Wingers Publishing. p.780.



LANDIS J. y KOCH G. (1977).The measurement of observer agreement for categorical data. Citado por CORTÉS Édgar ., RUBIO Jorge. y Gaitán Hernando. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. En: Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2010. vol. 61, no. 3. p 247-255

Latermann, Werner. New parrot handbook. New York. Barrows,1985. pg. 57

LEWIS, Gaunt., KENNETH, Oring., Daniel W. Anderson., Luis F. Baptista., Jon C. Barlow ., y John C. Wingfield Guía para la utilización de aves silvestres en investigación. Gaunt. Lewis W. Oring., Kenneth P. Able., Daniel W. Anderson., Luis F. Baptista., Jon C. Barlow ., y John C. Wingfield

LIZA, Jaqueline., MATURRANO, Lenin. y ROSADIO, Raúl. Determinación del sexo por ADN en cinco especies de guacamayos. En: Revista de investigación veterinaria del Perú. Junio, 2008. vol.19, no.1.

LONDOÑO ZAPATA, Carmen. Avifauna de la Universidad de Antioquia. Medellín: Universidad de Antioquia, 2006. p 24.

LUGO CARVAJAL. Consideraciones especiales para la reproducción de aves psitácidas nativas y exóticas. En: Memorias de la conferencia interna en medicina y aprovechamiento de fauna silvestre, exótica y no convencional. 2011.

ROBALDO G. N. y NETO S. P. Order psittaciformes (parrots, macaws, conures). En: FOWLER M.E. y CUBAS Z.S. Biology, medicine and surgery of sout american wild animals. Iowa, Iowa State University Press, 2001. p.168

MATTA CAMACHO, Nubia, *et al.* Determinación de Sexo en Aves Mediante Herramientas Moleculares. En: Acta biológica Colombiana. 2009. vol. 14, no. 1. p. 25 – 38

MITCEHELL, Mark; TULLY, Thomas. En: Manual of exotic pet practice . Saunders Elsevier, 2009. p.253.

ORJUELA, Delio. Introducción a la medicina de fauna silvestre en latinoamérica. Serrano, 2009. p 151.

RODRIGUEZ MAHECHA, Jose, *et al.* Loros, pericos y guacamayas neotropicales. Bogotá D.C: Copyright, 2005.186 p.

RODRÍGUEZ, José y HERNÁNDEZ, Jorge. Loros de Colombia. Conservación Internacional 2002. 478 p.

ROMAGNANO, A. Examination and Preventive Medicine Protocols in Psittacines. Citado por. VARELA, et al. Rehabilitación de fauna Silvestre. Bogotá, 2005. p. 53

SAMOUR, Jaime. Medicina Aviaria. 2 ed. Barcelona. Elsevier, 2010.p. 121 – 123.

Stell ., Gimenez y Sanches. La citogénica como herramienta en el sexaje de las aves. En: I congreso internacional de mejoramiento y aprovechamiento de fauna silvestre. Bogotá, agosto 25 – 27, 2005.

SITIO OFICIAL DE VICTORIA EN CALDAS. Disponible en internet: <<http://victoria-caldas.gov.co/index.shtml>>

SVENSSON, L. Guía para la identificación de los Paseriformes europeos. Citado por CAMPOS, Francisco, *et al.* Un nuevo criterio para sexar mirlos acuáticos *Cinclus cinclus* en la península ibérica. En: Revista Catalana de Ornitología. 2005. vol 21. p. 44

Via S, Lane R. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution*. 1985;39:505.

WERTHER, K. Noninfectious diseases. Citado por FOWLER, M. y CUBAS, Z. En: *Biology, medicine and surgery of south american wild animals*. Iowa. Iowa State University, 2001. p.168

# **ANEXOS**

## Anexo A . Protocolos de extracción y PCR

### PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN FENOL-CLOROFORMO-ALCOHOL ISOAMÍLICO - PCI

1. Si la muestra de tejido no puede ser alterado fácilmente, moler la muestra a un polvo fino en nitrógeno líquido con un mortero. Colocar 100 mg de tejido en polvo en un tubo de microcentrífuga. Los restos de polvo pueden ser almacenados a -80 ° C hasta que sea necesario. Para tejidos blandos, tales como musculo, los pasos 1 y 2 pueden ser innecesarios.

3. adicionar al tubo: 500  $\mu$  de buffer STE; 25  $\mu$  proteinase K (10 mg/rnl); 75  $\mu$  de SDS al 10%, mezclar bien e incubar durante 2 horas a 55 °C.

- ✓ Añadir un volumen igual de PCI (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico), mezclar e incuban a temperatura ambiente durante 5 mino
- ✓ Centrifugar durante 5 minutos a 7000 g (o en alta velocidad en una microcentrífuga).
- ✓ Retire con cuidado la fase acuosa con una micropipeta y transfierala a un tubo limpio.
- ✓ Añadir un volumen igual de CI (cloroformo-alcohol isoamílico), mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos, Centrifugar durante 3 min a 7000 g.
- ✓ Traspasar la fase acuosa superior a un nuevo tubo. Añadir 2,5 volúmenes de etanol frío al 95%, mezclar por inversión.
- ✓ Precipitar el ADN a -20 ° C durante al menos dos horas (una noche es preferible).
- ✓ Centrifugar el precipitado durante 10 minutos a 7000 g. Lavar el pellet dos veces con etanol al 70% y secar en una centrífuga de vacío.
- ✓ Resuspender el pellet en 250  $\mu$ L de buffer TE (Tris; EDTA). Incubar la muestra a 45-60°C. Comprobar la pureza y concentración de la muestra en un espectrofotómetro la concentración relativa también puede ser determinado por electroforesis en un gel de poliacrilamida o de

agarosa y comparando con un estándar. Diluir la muestra a la concentración deseada de trabajo con el TE<sup>60</sup>.

## PROTOCOLO DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERAZA AMPLIFICACIÓN DEL GEN CHD

La amplificación del fragmento del gen chd se ha realizado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores 2550F/2718R o P2/P8.

Para Fridolfsson *et al* el protocolo consistió en:

0.5 U de Taq polimerasa, 200 µM de dNTPs, 10 mM de Tris HCL pH 8.3, 50 mM de KCl, 1.75 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 2 pmol de cebadores 2550F (5'-GTTACTGATTCGTC-TACGAGA-3') y 2718R (5'-ATTG AAATGATC-CAGTGCTTG-3). Utilizó las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min; 30 ciclos de 95 °C durante 30s, 47 °C durante 30s y 72 °C durante 30s, con una extensión final de 72 °C durante 7 min. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 3% y la visualización realizó con bromuro de etidio<sup>61</sup>.

En el estudio realizado por Liza, Maturrano y Rosadio, se contempla que:

La reacción fue desarrollada siguiendo las condiciones descritas por Griffiths *et al.* (1998)<sup>62</sup> y, posteriormente, se optimizó realizando algunas modificaciones. Se empleó 20-50 ng de ADN genómico, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 2 mM de desoxirribonucleótidos (Promega), de 5-20 pmol de cada cebador (Sigma) P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT 3') y P8 (5'-CTCCAAGGATGAGRAAAYTG 3'), 0.5-1.5 U de Taq polimerasa (Promega) y 1 X de buffer de PCR (Promega), utilizando las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de denaturación inicial a 95 °C durante 5 min; 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 47 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, con una extensión final de 72 °C durante 7 min. Para la visualización de los productos de PCR, se diluyeron con Buffer Loading Gel 6X (Promega) a razón de 5:1 y separados en un gel de agarosa (Promega) al 3% durante 4 horas, a 120 v utilizando solución tampón TBE 0.5 X (Tris borato EDTA) en un sistema de electroforesis horizontal (Hybaid). Los productos de PCR fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador. Para la lectura de los resultados, la visualización de dos fragmentos en el gel de agarosa al 3%

---

<sup>60</sup> Hillis, D., Moritz, C & Mable, B. (Eds). 1996. Molecular Systematics. Second Edition. Sinauer Associates Inc. USA. p. 342 - 343

<sup>61</sup> FRIDOLFSSON A y ELLEGREN H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *En: Journal of Avian Biology*. Marzo, 1999. vol. 30, no. 1. p.116-121.

<sup>62</sup> GRIFFITHS R DOUBLE MC, ORR K, DAWSON RJ: A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*. 1998;7:1071-1075. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd Edition Cold Spring. 1989. Harbour Laboratory Press, New York.

correspondió al sexo hembra y la observación de un fragmento a individuos machos<sup>63</sup>.

---

<sup>63</sup> LIZA, Jaqueline., MATURRANO, Lenin. y ROSADIO, Raúl. Determinación del sexo por ADN en cinco especies de guacamayos. En: Revista de investigación veterinaria del Perú. Junio, 2008. vol.19, no.1.