

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Determinación del sexo en guacamayos de las especies
Ara ararauna, Ara macao, Ara chloropthera, Ara
militaris, Propyrrhura couloni mediante el uso del
ADN**

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTORA

Jacqueline Susann Liza Rodríguez

Lima – Perú

2006

ÍNDICE

Índice	i
Resumen	ii
Summary	iii
Abreviaturas	iv
Lista de tablas	v
Lista de figuras	vi
I.- Introducción	1
II.- Revisión Literaria	2
1. Características Generales de los Guacamayos	2
2. Características Específicas de los Guacamayos	3
3. Importancia de los Guacamayos en el Medio Ambiente	14
4. Situación Actual de los Guacamayos	14
5. Métodos tradicionales de sexaje en aves silvestres y domésticas	19
6. Cromosomas en las Aves	23
7. Técnicas Moleculares utilizadas en la Determinación del Sexo en Aves	26
III.- Materiales y Métodos	43
1. Materiales	43
2. Metodología	47
IV.- Resultados	49
V.- Discusión	53
VI.- Conclusiones	55
VII.- Literatura citada	56

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
T_m	Temperatura de fusión
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RAPD	Polimorfismo de ADN amplificado al azar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EtBr	Bromuro de etidio
Mg²⁺	Iones Magnesio
Bp	Par de base

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1 Especies de aves vulnerables al comercio ilegal de especímenes y/o productos.
- Tabla 2 Especies aviarias en donde los cebadores de tipo RAPDs produjeron fragmentos específicos de hembra.
- Tabla 3 Especies que fueron sexadas mediante el uso de cebadores P2 y P8.
- Tabla 4 Situación actual de las especies de aves previamente sexadas utilizadas para el estudio.
- Tabla 5 Métodos de sexaje de las aves empleadas para la estandarización de la prueba de ADN.
- Tabla 6 Lista y Procedencia de las especies de los guacamayos del estudio sin sexo conocido.
- Tabla 7 Sexo obtenido por ADN en el grupo de especies con sexo previamente conocido.
- Tabla 8 Sexo obtenido por ADN en el grupo de especies sin sexo conocido.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 *Ara ararauna*, Guacamayo azul y amarillo.
- Figura 2 Distribución geográfica de *Ara ararauna*.
- Figura 3 *Ara macao*, Guacamayo rojo o escarlata.
- Figura 4 Distribución geográfica de *Ara macao*.
- Figura 5 *Ara chloroptera*, Guacamayo rojo y verde.
- Figura 6 Distribución geográfica de *Ara chloroptera*.
- Figura 7 *Ara militaris*, Guacamayo verde o militar
- Figura 8 Distribución geográfica de *Ara militaris*.
- Figura 9 *Propyrrhura couloni*, Guacamayo cabeza azul.
- Figura 10 Distribución geográfica de *Propyrrhura couloni*.
- Figura 11 Cariotipo del ave de presa de ala negra (*Elanus caeruleus*).
- Figura 12 Cromosomas sexuales de la hembra y el macho en las aves.
- Figura 13 Fases de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Figura 14 Regiones conservadas en los cromosomas sexuales de la hembra y del macho.
- Figura 15 Perfiles de RAPDs que permiten la determinación del sexo en 7 especies de aves.
- Figura 16 Detección de genotipos de cromosomas ZW y ZZ durante la técnica de sexaje por ADN.
- Figura 17 Secuencia de nucleótidos de una región del gen CHD de ratón, pollo y el pinzón zebra.
- Figura 18 Identificación del sexo mediante la PCR usando cebadores P2 y P8.
- Figura 19 Visualización de los productos de PCR en guacamayos de sexo conocido.

RESUMEN

Con la finalidad de estandarizar una prueba para la determinación del sexo en guacamayos se procedió a extraer de 25 – 50 ng. de ADN genómico de sangre de 31 aves previamente sexadas, pertenecientes a 5 especies de guacamayos (*Ara ararauna*, *Ara chloropthera*, *Ara macao*, *Ara militaris* y *Propyrrhura couloni*) provenientes del Patronato del Parque de Las Leyendas (PATPAL) y de un zocriadero privado, mediante un kit de extracción de ADN (Wizard® Promega). El método empleado fue la técnica del PCR la cual amplificó un fragmento del gen CHD del cromosoma W presente solo en aves hembras (CHD-W), utilizando a los cebadores P2 (5'- TCTGCATCGCTAAATCCTTT - 3') y P8 (5'- CTCCCAAGGATGAGRAAAYTG – 3' R = A / G, Y = T / C) capaces de amplificar regiones no conservadas (intrones) de este gen, lo cual lo diferencia de su gen homólogo presente en los machos (CHD-Z). La amplificación se llevó a cabo tras la optimización de las condiciones y los ciclos termales, partiendo de las condiciones descritas por Griffiths *et al.*, (1998). Los productos obtenidos fueron separados en gel de agarosa al 3% (Promega) utilizando un sistema de electroforesis horizontal (Hybaid) y visualizados mediante fluorescencia con bromuro de etidio a través de la luz ultravioleta, con lo cual se pudo observar 2 fragmentos en aves hembras y 1 fragmento en aves machos, estos fragmentos estuvieron comprendidos entre 300 - 400 bps. En este grupo se logró sexar a las 31(100%) aves y se obtuvo un 100% de compatibilidad entre los resultados obtenidos por métodos convencionales y por análisis de ADN. Posteriormente se procedió a sexar 28 guacamayos sin sexo conocido, bajo las condiciones anteriormente descritas, lográndose determinar el sexo de estas.

Palabras claves: gen CHD; Cebadores P2 y P8; Guacamayos; Sexo.

SUMMARY

With the purpose of standardizing a test for the determination of the sex in macaws we proceeded to extract of 25-50 ng. of genomic DNA from the blood of 31 birds previously sexed, belonging to 5 species of macaws (*Ara ararauna*, *Ara chloroptera*, *Ara macao*, *Ara militaris* and *Propyrrhura couloni*) coming from the Patronato del Parque de Las Leyendas Zoo and a private center, using an extraction kit of DNA (Wizard® Promega). The used method was the technique of the PCR which amplified a fragment of the CHD gene of the female exclusive chromosome W (CHD-W), using the P2 (5' - TCTGCATCGCTAAATCCTTT - 3') and P8 (5' - CTCCCAAGGATGAGRAAAYTG-3' R = A / G, Y = T / C) primers, which are able to amplify not conserved regions (introns) of this gene. This differentiates it of its male homologous gene (CHD-Z). The amplification was carried by the optimization of the conditions and the thermal cycles. It was based on the conditions described by Griffiths *et al.* (1998). The obtained products were separated in agarosa gel to 3% (Promega) using a horizontal electrophoresis system (Hybaid) and visualized by fluorescence with etidio bromide through the ultraviolet light. Then we can see 2 fragments in female birds and only one in male birds, these fragments were between 300 - 400 bps. In this group 31(100 %) birds were sexing and we obtain 100% of compatibility between the conventional methods and DNA analysis. Finally, with the conditions previously described we sex 28 macaws with unkowned sex

Key words: CHD gene; P2 and P8 Primers; Macaws; Sex.

I. INTRODUCCIÓN

En el mundo la mayor biodiversidad animal corresponde a las aves silvestres con un total de 9198 especies. El Perú ocupa el segundo lugar con 1701 especies aviarias, siendo Colombia el país con mayor biodiversidad a nivel mundial (Pulido, 1991). En el territorio peruano, por D.S. 034-2004-AG, existen 172 especies aviarias en peligro de extinción, de las cuales 15 pertenecen al orden de los psitácidos; aquí se encuentran 4 especies de guacamayos clasificados en situación vulnerable (El Peruano, 2004).

En los guacamayos, como en la mayoría de especies de psitácidos, la determinación del sexo presenta dificultades debido a la ausencia de dimorfismo sexual, por lo cual se torna difícil establecer la formación de parejas de reproducción en cautiverio. Esto disminuye las posibilidades de éxito en el aumento de la población silvestre mediante programas de reintroducción.

Ante esta realidad, se cuenta con diversos métodos de sexaje como la endoscopia, determinación de niveles hormonales, cariotipo y la observación del comportamiento; sin embargo estas técnicas presentan ciertas desventajas como el ser traumáticas y estresantes, incapacidad de establecer el sexo de aves jóvenes, complejidad de la prueba y demanda excesiva de tiempo. En tal sentido, una herramienta más eficaz resulta ser el análisis genético. Al contrario de lo que sucede en mamíferos, las aves presentan los cromosomas heterogaméticos (ZW) en las hembras, mientras que los machos los homogaméticos (ZZ). El hallazgo de un gen asociado solo al cromosoma W y su uso como marcador haría posible la identificación de los individuos hembra; sin embargo este gen también está presente en los machos. Por lo tanto, con el fin de diferenciar los sexos se ha desarrollado una prueba de PCR, que involucra el uso de los primers P2 y P8, capaces de diferenciar estos genes siendo así eficiente en el sexaje de un gran número de especies aviarias (Griffiths *et al.*, 1998).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS GUACAMAYOS

Los guacamayos son aves que se hallan en las regiones tropicales del mundo, extendiéndose a las regiones templadas del sur (INRENA, 1990; Clements y Shany, 2001). Son abundantes y distribuidos ampliamente en Sudamérica, se caracterizan por ser aves ruidosas y conspicuas, que poseen un plumaje muy colorido, un pico grueso, corto, en forma de gancho y patas con tarsos cortos y robustos que tienen el primer y cuarto dedo orientados hacia atrás, mientras que el segundo y tercero están dirigidos hacia delante, constituyéndose en un órgano prensil (INRENA, 1990). En la mayoría de las especies, la mandíbula superior tiene un borde aserrado que facilita la retención de semillas y es extraordinariamente móvil lo que les permite trepar y sujetarse a manera de un tercer miembro locomotor (INRENA, 1990).

La clasificación taxonómica de estas aves es la siguiente:

- Reino: *Animalia*
- Phylum: *Chordata*
- Clase: *Aves*.
- Superorden: *Neognathae*
- Orden: *Psittaciformes*
- Familia: *Psittacidae*
- Subfamilia: *Psittacinae*
- Género: *Ara*.
- Especie: *Ara ararauna*, Linnaeus, 1758; *Ara macao*, Linnaeus, 1758; *Ara chloroptera*, G. R. Gray, 1859; *Ara militaris*, Linnaeus, 1766; y *Ara couloni*, Sclater, 1876 (UNEP,

2005). La especie *Ara couloni* es llamada en la actualidad *Propyrrhura couloni*, Miranda-Ribeiro, 1920 (UNEP, 2005; Birdlife International, 1997).

Además se alimentan de frutos, nueces y semillas, anidan en hoyos de los árboles y ponen huevos blancos y redondos, muchos loros neotropicales visitan las colpas (así se le llama a la tierra que es ingerida por estos animales, la cual es fuente importante de minerales), pero el valor nutritivo de este suplemento no está determinado (INRENA, 1990; Clements y Shany, 2001; Hilty y Brown, 1986).

El tamaño de los psitácidos es variable y va desde un lorito pigmeo cabeza azul de Nueva Guinea que mide 8 cm. hasta el guacamayo Jacinto de sudamérica de un metro de largo (Birdlife International, 1997). Los guacamayos y los loros Amazona sp. son los miembros más grandes de esta familia; tienen la cola larga en punta y con una sola pluma al medio; presentan la cara blanca con líneas muy finas de plumas llamadas pennas (INRENA, 1990).

2. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE LOS GUACAMAYOS

2.1. *Ara ararauna*:

Nombre común: Guacamayo Azul y Amarillo (Clements y Shany, 2001; INRENA, 1990).

a. Distribución:

El Guacamayo Azul y Amarillo es natural de las Américas; su ubicación comprende Panamá, Colombia, Venezuela (desde el sur del Orinoco hasta el norte de Monagas), las Guayanas, Ecuador, Perú (región Amazónica al este), Bolivia (región Amazónica al norte y este), Paraguay y Brasil, hasta Mato Grosso y São Paulo (Birdlife International, 1997; INRENA, 1990).

b. Características:

Presenta las plumas de la cabeza, lomo y cola de color azul; mientras que las plumas de la frente son de color verde y las plumas del pecho de color amarillo. El pico

es de color negro, la cara es blanca desprovista de plumas, solo presenta hileras de pennas o plumas finas de color negro (Hilty y Brown, 1986; Clements y Shany, 2001). Este guacamayo mide entre 73 y 86 cm. de longitud, con un peso de 1040 a 1286 gramos (INRENA, 1990).

Habita en zonas de bosque húmedo-tropical (terreno ubicado al este de los andes) que se inundan todos los años y en tierras pantanosas, se le documenta desde el nivel del mar hasta los 700 m.s.n.m.; es más frecuente a menos de 500 m.s.n.m. (Parker *et al.*, 1982; Clements y Shany, 2001). Se les observa en las palmeras altas, pantanos y a lo largo de los cursos de los ríos, formando parejas y grupos que pueden albergar a más de 25 individuos; no salen de los bosques densos durante los meses secos, pero durante las estaciones lluviosas se desplazan a considerables distancias (INRENA, 1990).

Anida en los huecos de las palmeras, principalmente de la *Mauritia* y la nidada usual consiste de uno a tres huevos, que son colocados durante los meses de Enero a Febrero (Birdlife International, 1997). Se alimenta de semillas, frutos castañas y probablemente de vegetales, prefiriendo los frutos de palmas *Mauritia vinifera* y otras como el *Astrocaryum sp.* *Bactris sp.* y *Maximiliana sp.* (Birdlife International, 1997; INRENA, 1990).



Fig. 1. *Ara ararauna*, Guacamayo Azul y amarillo.

Fuente: CITES, 2005.

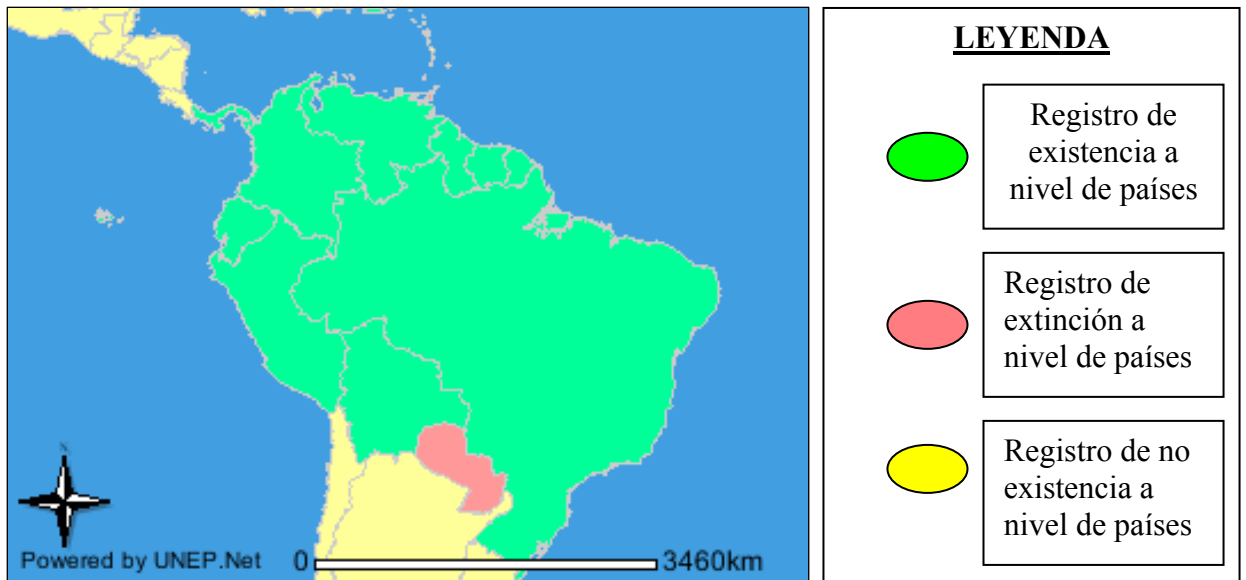


Fig. 2. Distribución geográfica de *Ara ararauna*.

Fuente: CITES, 2005.

2.2. *Ara macao*

Nombre común: Guacamayo Rojo o Escarlata (Clements y Shany, 2001; Pautrat *et al.*, 2002b)

a. Distribución:

Medio Norte de Brasil; Norte de Bolivia (Santa Cruz de la Sierra); Este de Perú (Loreto, Ucayali y Madre de Dios); Extremo Este de Ecuador; Este y Norte de Colombia (Magdalena y Trinidad); Sur de Venezuela; Guyana; Surinam y Guyana Francesa. En Centro-América desde Panamá hasta el Sur-Este de México, excepto Yucatán (INRENA, 1990; Pulido, 1991; Birdlife International, 1997).

b. Características

Tiene una longitud aproximada de 85 cm.; las plumas del cuerpo son de color rojo brillante; las plumas cobertoras de las alas de color amarillos variando a verde, mientras que las plumas primarias y secundarias alares son azules, la cola es de color rojo brillante, moteada con azul pálido y termina en punta (INRENA, 1990). Presenta la cara blanca y desprovista de plumas, la mandíbula inferior del pico es negro plumizo y la superior es amarillo-cremosa con la base negra (Hilty y Brown, 1986; INRENA, 1990). Habita en las tierras bajas del bosque lluvioso tropical arriba de los 900 m.s.n.m. (Parker III, 1982; Birdlife International, 1997). Hilty y Brown (1986) reportan a esta ave hasta los 500 m. en zonas de bosque húmedo tropical.

Se alimenta de los frutos de las palmeras, higos, bayas y nueces, aunque durante la temporada de reproducción también consumen insectos y las larvas de estos (INRENA, 1990; Birdlife International, 1997). La temporada de reproducción empieza a inicios de Diciembre, en las zonas sureñas dentro de su distribución, mientras que en el Norte comienza después. En el Perú se inicia en el mes de Abril (Birdlife International, 1997) y las nidadas consisten de 1 a 4 huevos (Brightsmith, 2003), ubicándose en las cavidades naturales de los árboles, principalmente en la palmera *Iriarthea* en el Perú (Birdlife International, 1997).



Fig. 3. *Ara macao*, Guacamayo rojo o escarlata

Fuente: CITES, 2005.

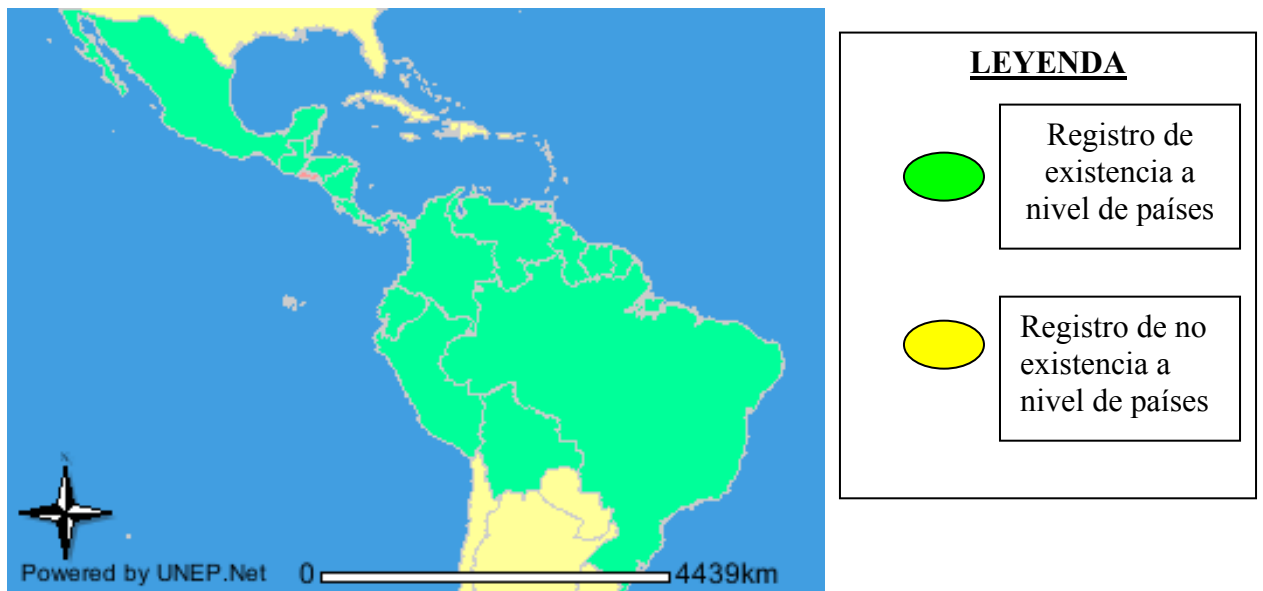


Fig. 4. Distribución geográfica de *Ara macao*.

Fuente: CITES, 2005.

2.3. *Ara chloroptera*

Nombre común: Guacamayo rojo y verde (Clements y Shany, 2001).

a. Distribución:

Se distribuye al este de Panamá, al noreste de Colombia, generalmente a través del este de los Andes, Venezuela hacia las Guineas, Brasil hasta el sur de Paraná y Mato Grosso; Ecuador; este del Perú y nor-este de Bolivia; Paraguay y Argentina hacia el norte de Formosa (INRENA, 1990; Birdlife International, 1997).

b. Características:

Las plumas de la cabeza y cuerpo son de color rojo, las alas tienen plumas rojas, verdes y azules, la cola presenta plumas de color rojo y azul; la cara es blanca desprovista de plumas con pequeñas líneas de pennas o plumas finas de color rojo, el pico presenta la mandíbula superior de color blanco y la mandíbula inferior negra (INRENA, 1990).

Habita en las selvas tropicales húmedas de tierras bajas, en las riberas de los ríos y en las colinas (Pulido, 1998; Parker III, 1982). Se le documenta desde el nivel del mar hasta los 1500 metros de elevación (Birdlife International, 1997).

Anida en los hoyos de los árboles, en las grietas de las rocas y en la arcilla en las barrancas y la nidada consiste de dos a tres huevos de forma elíptica; se alimenta de semillas grandes y frutas, semillas, nueces y bayas (INRENA, 1990).



Fig. 5. *Ara chloroptera*, Guacamayo rojo y verde.

Fuente: CITES, 2005.

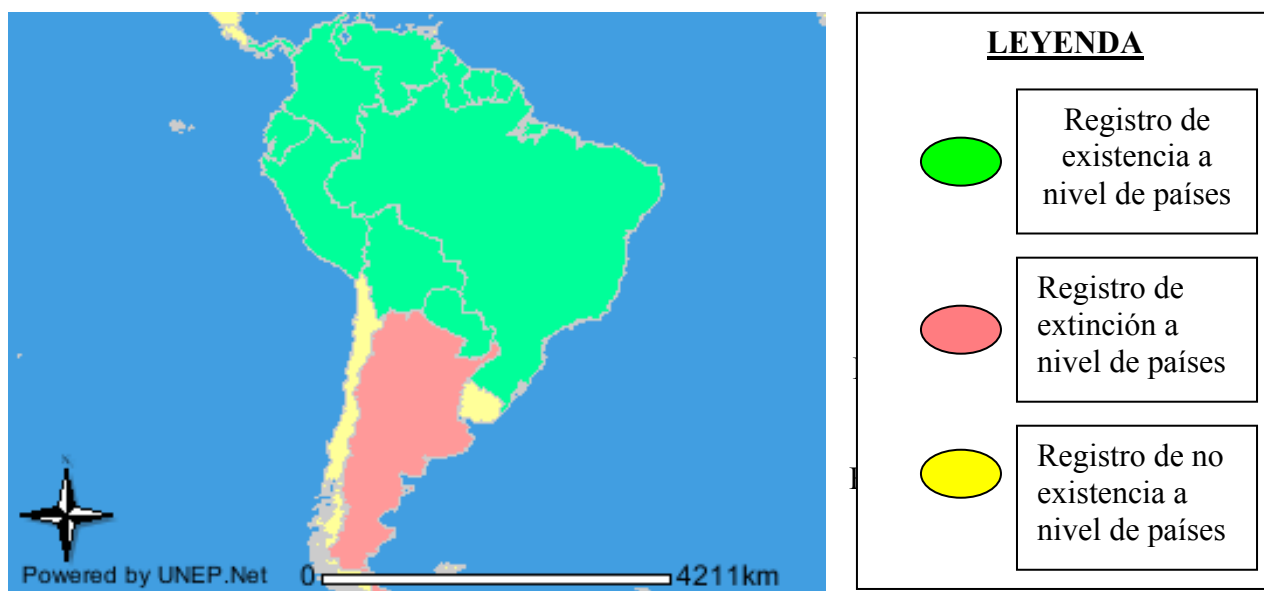


Fig. 6. Distribución geográfica de *Ara chloroptera*.

Fuente: CITES, 2005.

2.4. *Ara militaris*

Nombre común: Guacamayo verde o militar (Clements y Shany, 2001).

a. Distribución:

Su ubicación se extiende desde México hasta el norte de Argentina en una distribución que no es continua (se ausenta de América Central, aunque es posible que habite en Guatemala); lo volvemos a encontrar al norte de Colombia y Venezuela, en el sureste de Ecuador, continuando su ubicación al este inmediato de los Andes en dos o tres extensas localidades hasta el norte de Argentina, hasta Salta (INRENA, 1990).

En el Perú se distribuye en el norte, en los departamentos de Lambayeque y Cajamarca (INRENA, 1990).

b. Características:

Las plumas del cuerpo son de color verde oliva brillante y las plumas de la frente de color rojo, el pico es completamente negro; la cara es blanca con pequeñas hileras de plumas finas o pennas de color negro. Tiene una longitud de 66 a 71 cm. (INRENA, 1990; Birdlife International, 1997).

Habita en selva baja y selva alta, en los bosques tropicales de tierras bajas, en zonas montañosas y en los bosques de pinos y robles (Pulido, 1998; Parker III, 1982). Se le documenta entre los 600 y 2600 m.s.n.m (Birdlife International, 1997), anida en los hoyos de los árboles y la nidada consiste de 2 a 3 huevos, se alimenta de semillas grandes y frutas (Birdlife International, 1997).



Fig. 7. *Ara militaris*, Guacamayo verde o militar.

Fuente: CITES, 2005.

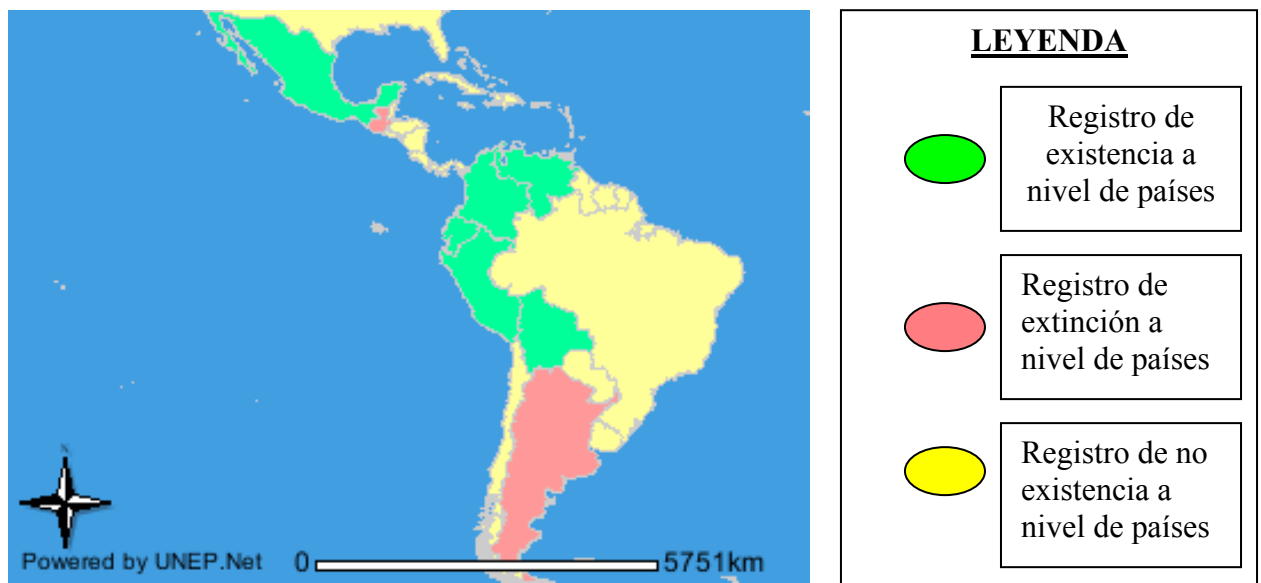


Fig. 8. Distribución geográfica de *Ara militaris*.

Fuente: CITES, 2005.

2.5. *Propyrrhura couloni*

Nombre común: Guacamayo Cabeza Azul (Clements y Shany, 2001; INRENA, 1990)

a. Distribución:

A lo largo de la zona central de sudamérica, entre los bordes limítrofes entre Brasil y Perú (Clements y Shany, 2001).

En el Perú, se distribuye en la selva baja de Loreto, Ucayali, Madre de Dios y en Selva Alta en Huanuco (Pulido, 1998; INRENA, 1990)

b. Características:

Habita las tierras bajas del bosque lluvioso tropical arriba de los 500 m. (Parker III, 1982) y presenta las plumas del cuerpo de color verde con la frente y la cabeza azul, variando a verde en el cuello, mejillas color verde azulado y plumas de la zona perioftálmica de color verde con un iris amarillento (INRENA, 1990; Birdlife International, 1997).

El pico es de color negro en la base de la mandíbula superior (zona proximal) con color blanco nacarado en el resto del pico, con una zona color esmalte en el techo del extremo de la mandíbula superior; en la cola, las zonas dorsales son de color granate y las zonas ventrales de color verde amarillento (INRENA, 1990).

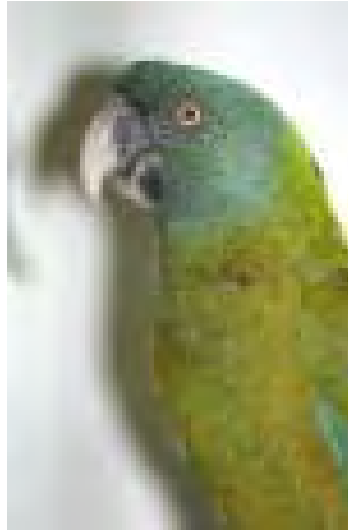


Fig. 9. *Propyrrhura couloni*, Guacamayo cabeza azul.

Fuente: CITES, 2005.

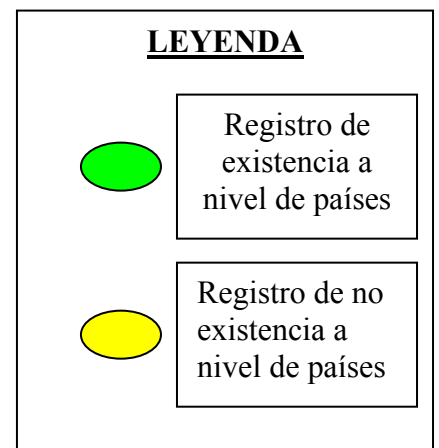
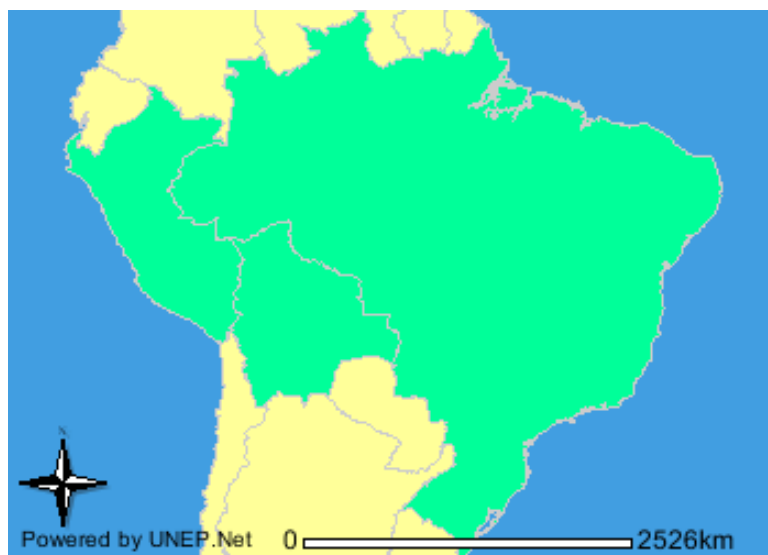


Fig. 10. Distribución geográfica de *Propyrrhura couloni*

Fuente: CITES, 2005.

3. IMPORTANCIA DE LOS GUACAMAYOS EN EL MEDIO AMBIENTE

Por cada especie de ave extinta se origina un costo biológico total a largo plazo, ya que es probable que también desaparezcan 35 especies de vegetales y 90 especies de insectos, algunos de los cuales podrían contener material genético a partir del cual se podría sintetizar nuevos productos farmacéuticos o especias agrícolas (Perrins, 1991). Por lo dicho anteriormente, las aves son indicadores sensibles de la salud de nuestro ambiente, desafortunadamente la biología básica de las especies de guacamayos ha sido poco estudiada lo que hace su conservación más difícil (Brightsmith y Figari, 2003).

4. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS GUACAMAYOS

4.1. Problemática Actual de los Guacamayos

La principal problemática que esta llevando a los psitácidos hacia la extinción es el comercio ilegal (Pautrat *et al.*, 2002a). Es así, que cada año por lo menos 8 millones de aves silvestres en el mundo son extraídas de sus ambientes naturales para ser comercializadas, siendo los mercados mas importantes para la venta de estos animales los Estados Unidos de Norteamérica, Rusia, Japón y Europa Oriental, lo cual es confirmado por las estadísticas de decomisos en aeropuertos que maneja el INRENA (Pautrat *et al.*, 2002b) así por ejemplo se estima que anualmente 255 000 aves exóticas son introducidas a los Estados Unidos de Norteamérica ilegalmente a través de la frontera con México, de las cuales aproximadamente la mitad muere durante el transporte, debido a que las personas que las comercializan les suministran tranquilizantes con el fin de facilitar su transporte (hay que considerar que son animales de vocalización fuerte y muy móviles) lo que pone en riesgo la vida del animal (Pautrat *et al.*, 2002b).

Los principales fines de comercialización de estas aves son la tenencia de estas como mascotas, interés de coleccionistas y centros de reproducción; interesa también la comercialización de animales muertos que en su totalidad o en partes son utilizados para taxidermia, artesanías, prácticas mágico-religiosas o medicinas folklóricas, entre otras (Pautrat *et al.*, 2002a). En estos casos están involucrados productos y subproductos tales como pieles, huesos, órganos internos, plumas, dientes y picos (Pautrat *et al.*, 2002a).

A nivel nacional el comercio de aves como mascotas afecta principalmente a varias especies de loros, pericos pero principalmente guacamayos., destacando los mercados de comercialización informal ubicados en el departamento de Lima, a donde llegan especímenes de Chiclayo, Piura y Pucallpa (Pautrat *et al.*, 2002).

Otro problema importante es el deterioro del hábitat, ya que la tala de árboles en los bosques para la agricultura, para poder obtener madera y para fabricar papel, ha originado que la Selva Tropical, que sustenta la mayor diversidad de fauna silvestre del planeta, se esté perdiendo a razón de 10 millones de hectáreas por año, lo que equivale a la superficie de Austria (Perrins, 1991; Miyaki *et al.*, 1998) y esto a su vez, genera un gran impacto en los guacamayos debido a que se les priva de los grandes árboles necesarios para la formación de las galerías, de los nidos y para la reproducción, estos árboles son los mismos que demoran cientos de años en alcanzar el tamaño adecuado para la construcción de galerías (Chambers *et al.*, 1998).

En los bosques tropicales, la mayoría de poblaciones de guacamayos grandes están en peligro o disminuyendo debido a una combinación de caza, pérdida del hábitat y colectas para el mercado de mascotas. Una de las formas que grafica esta situación ocurre con los cazadores de polluelos, quienes talan los árboles con nidos con el fin de extraer los polluelos de guacamayos.

4.2. Legislación Peruana para la Protección de Fauna Silvestre.

La legislación peruana contempla la importancia de los recursos naturales y con ello la necesidad de fomentar su conservación y un buen uso de los mismos, todo esto a través de leyes, así como mediante la adhesión a tratados internacionales (Pautrat *et al.*, 2002a).

Es así que la ley forestal y de fauna silvestre (n° 27308) designa a los órganos encargados de promover, gestionar y administrar los recursos de flora y fauna silvestre. En este sentido, el Ministerio de Agricultura es el órgano normativo y promotor del uso sostenible y de la conservación de los recursos forestales y de fauna silvestre; y el Instituto Nacional de Recursos Naturales (INRENA) se encarga de gestionar y administrar los recursos forestales y de fauna silvestre a nivel nacional (Pautrat *et al.*, 2002a).

El INRENA fue creado por decreto supremo ley (n ° 25902) y es el órgano encargado de promover y apoyar el uso sostenible de los recursos naturales renovables, orientando a contribuir al desarrollo del país; cuyo objetivo principalmente es promover el manejo y aprovechamiento racional e integral de los recursos naturales renovables y su entorno ecológico para lograr el desarrollo sostenible (Pautrat *et al.*, 2002a).

El Perú forma parte dentro de los tratados internacionales, de la Convención Internacional de las Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES), la cual mediante el decreto ley (n° 21080) fue aprobado en 1975. Esta tiene por objetivo lograr la cooperación nacional para la protección de especies de flora y fauna silvestre y reprimir su explotación excesiva por causa del comercio internacional (INRENA, 1990).

Para esto el CITES elabora 3 listas llamadas APENDICES I, II, y III, las que contienen las especies en vías de extinción, especies amenazadas y otras que sin estar en esta condición han sido incluidas a solicitud de uno o dos “países-parte” (se denomina así a los países que son miembros de este tratado) los cuales vigilan el comercio de las especies incluidas en estos tres apéndices de la convención (Pautrat *et al.*, 2002).

Las características de cada apéndice son las siguientes:

- APENDICE I: “Incluye todas las especies en vías de extinción que son o pueden ser afectadas por el comercio. El comercio de estas especies deberá estar sujeto a reglamentación particularmente estricta a fin de no poner en peligro su supervivencia y se autorizará solamente bajo circunstancias excepcionales” (CITES, 1973; INRENA, 1990).
- APENDICE II: Incluye.-
 - a.- “Todas las especies que si bien en la actualidad no se encuentran necesariamente en peligro de extinción, podrían llegar a esa situación a menos que el comercio en especímenes de dichas especies esté sujeto a una reglamentación estricta”.
 - b.- “Aquellas otras especies no afectadas por el comercio, que también deberán sujetarse a reglamentación con el fin de permitir un eficaz control del comercio en las

especies a las que se refiere el sub-párrafo (a) del presente párrafo” (CITES, 1973; INRENA 1990).

- APENDICE III: “incluye todas las especies que cualquiera de las “países–parte” manifieste que se hallan sometidos a reglamentación dentro de su jurisdicción con el objeto de prevenir o restringir su explotación, y que necesitan la cooperación de otros “países –parte” para lograr un adecuado control de su comercio” (CITES, 1973; INRENA, 1990).

Tabla 1. Especies de aves vulnerables al comercio ilegal de especímenes y/o productos.

FAMILIA	NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO	PROCEDENCIA	ESTADO DE CONSERVACION		OBSERVACIONES (USOS Y AMENAZAS)
				CITES	D.S.034-2004AG	
PSITACIDAE	Guacamayo cabeza azul	<i>Propyrrhura couloni</i>	SB	II	VULNERABLE	mascota, turismo, artesanía, subsistencia
	Guacamayo azul y amarillo	<i>Ara ararauna</i>	SB	II	VULNERABLE	mascota, turismo, artesanía, subsistencia
	Guacamayo rojo	<i>Ara macao</i>	SB	I	VULNERABLE	mascota, turismo, artesanía, subsistencia
	Guacamayo verde o militar	<i>Ara militaris</i>	SA/SB	I	VULNERABLE	mascota, turismo, artesanía, subsistencia
	Guacamayo rojo y verde	<i>Ara chloroptera</i>	SB	II	VULNERABLE	mascota, turismo, artesanía, subsistencia

SA: Selva Alta

SB: Selva Baja

Fuente: Modificado de Pautrat *et al.*, 2002b

5. MÉTODOS TRADICIONALES DE SEXAJE EN AVES SILVESTRES Y DOMÉSTICAS

5.1. Sexaje Quirúrgico.

El sexaje quirúrgico fue el primer método que se usó para la determinación sexual en las aves, siendo el más usado en los psitácidos monomórficos (Kirk, 1997).

Existen dos técnicas de sexaje quirúrgico: la laparotomía y la laparoscopia; el fundamento de ambas es la visualización directa de los órganos sexuales del ave y comprobar si las gónadas, testículo u ovario, corresponden a un macho o hembra respectivamente.

Para la realización del sexaje quirúrgico es necesario anestésicar al ave. La intervención consiste en una incisión del abdomen entre las 2 últimas costillas, para esto se tiene en cuenta que los machos tienen un par de testículos ubicados a ambos lados de la columna vertebral, pero la hembra únicamente tienen un ovario funcional ubicado en el lado izquierdo del cuerpo, es por esta razón que la incisión se realiza en este lado del abdomen. A continuación se detallará ambas técnicas.

- a. Laparotomía: La incisión es mayor para que permita la inserción de una sonda de metal la cual es usada para desplazar los intestinos y permitir la examinación de gónadas, las cuales están cerca de la columna vertebral y por debajo del costillar (Risser, 1971).
- b. Laparoscopia: Esta técnica es más refinada, se necesita de una incisión más pequeña a través de la cual se introduce una sonda, por la cual se ingresa el gas CO₂ para que los órganos se separen de la pared abdominal y sea más fácil su observación; a través de este corte se introduce un aparato compuesto por una fuente de luz fría para no quemar las vísceras y un sistema de lentes llamado endoscopio a través del cual se da una mejor visualización. (Richner, 1989).

Las ventajas de ambas técnicas son su validez para todas las especies de aves y su confianza del 100% para la visualización directa de las gónadas, por otro lado las

desventajas son el riesgo quirúrgico existente tanto por la anestesia, como por la intervención en sí, el estrés que genera en el animal; en las aves pequeñas con un peso de apenas unos gramos es más dificultosa la técnica debido a la escala de la cirugía, así mismo en ejemplares jóvenes no es posible la diferenciación de las gónadas y en animales obesos la visualización se ve dificultada por los depósitos de grasa (Griffiths, 2000).

5.2. Sexaje por Cariotipo o Análisis Cromosómico.

Para este análisis se necesita una pluma con sangre del ave; luego este tejido de la pulpa se desarrolla en cultivo de células vivas durante 7 a 9 días (Kirk, 1997). Una vez incrementado el número de células se tiñe con una preparación concentrada de un componente llamado colchicina, el cual detiene el ciclo celular cuando los cromosomas están condensados y más visibles (Griffiths, 2000). Luego se realizan extendidos para examinarlos, comparando sus características de tamaño, forma, posición centromérica, y sus cualidades de tinción (Griffiths, 2000).

Una ventaja de este método es que tiene la posibilidad de identificar defectos cromosómicos como inversiones, translocaciones y triploidia las cuales producen mala actividad reproductiva, reducción de casi el 50% de la fertilidad e infertilidad respectivamente (Kirk, 1997); por otro lado, es un método inocuo para el ave. Entre sus desventajas podemos señalar que solo se puede realizar en polluelos y luego de la muda, debido a que el medio de cultivo requiere de células vivas de la pulpa de plumas en crecimientos (Griffiths, 2000); otra desventaja es que el ave tiene un número grande de cromosomas con rangos que van desde 40 a 126 cromosomas, teniendo la mayoría alrededor de 80, lo que dificulta un buen extendido de la muestra (Christidis, 1990); a su vez es una técnica larga, compleja, laboriosa, y la confianza del resultado depende en gran medida de la pericia del técnico.

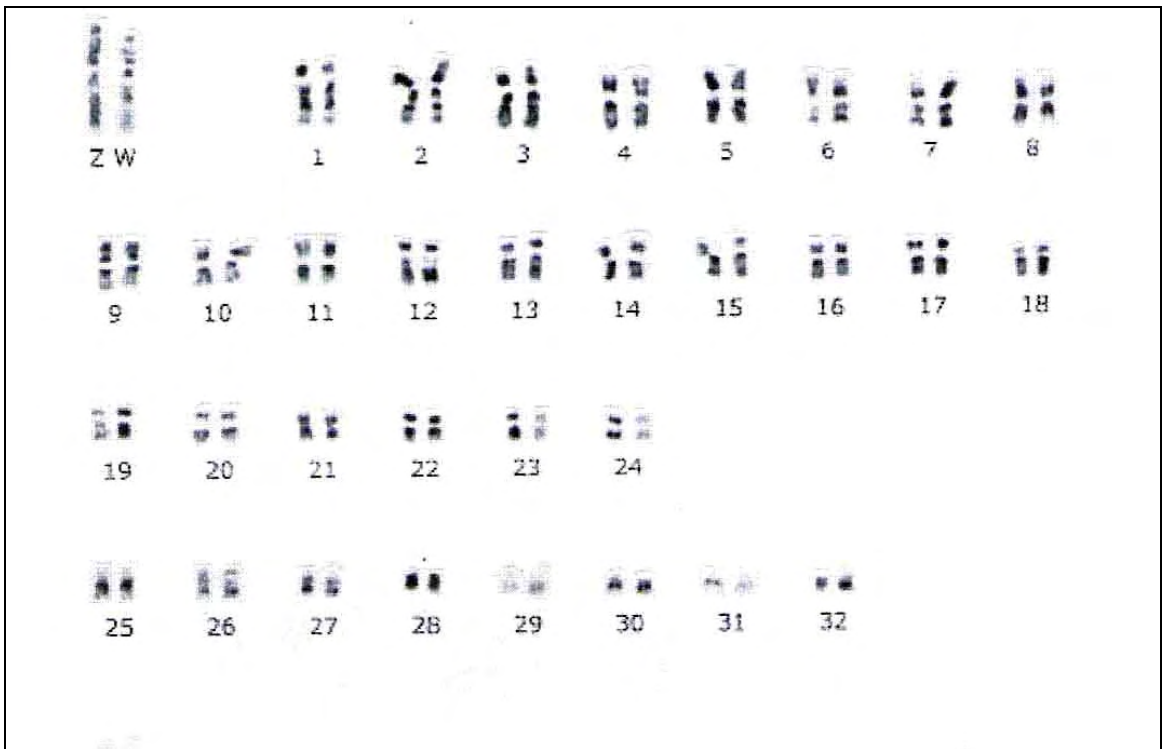


Fig. 11: Cariotipo del ave de presa de ala negra (*Elanus caeruleus*).

Se observa de izquierda a derecha el par de cromosomas sexuales y los 32 autosomas del genoma.

5.3. Sexaje por Determinación de Niveles Hormonales.

Esta técnica consiste en la medición de esteroides sexuales en las heces, desechos de huevos o plasma para la determinación del sexo y valorar la actividad funcional de los órganos reproductores. La desventaja de esta técnica es la imposibilidad de determinar el sexo de aves inmaduras o de actividad gonadal baja (Kirk, 1997).

5.4. Dimorfismo Sexual.

Se dice que una especie presenta dimorfismo sexual cuando existen diferencias visibles entre los machos y las hembras, este es el método más sencillo de sexaje en aves; sin embargo, no todas las especies presentan dimorfismo sexual, lo que implica que hay especies en las cuales los sexos son indistinguibles por su aspecto externo, este el caso de las aves psitácidas las cuales son en su mayoría monomórficas (Kirk, 1997).

El dimorfismo sexual lo encontramos con frecuencia en aves psitácidas de Australia y Asia, en tanto que las especies neotropicales (centro y sudamérica) y africanas son típicamente monomórficas; esto es debido a que las aves que habitan en climas áridos tienen una mayor dependencia en la identificación visual que las especies selváticas o de bosques (Kirk, 1997).

En casi todas las especies que muestran dimorfismo sexual el plumaje de los individuos jóvenes es muchas veces muy similar o idéntico al de las hembras, por lo cual podemos confundir un individuo inmaduro con una hembra (Kirk, 1997). Por último, este método no nos permite diferenciar el sexo de los individuos en edad precoz (puede ser necesario esperar incluso años), este es el caso de los periquitos asiáticos, quienes presentan el plumaje dimorfo del adulto entre el año y medio y los 2 años y medio de edad después de alcanzar la madurez sexual. Entre las ventajas más destacables de esta técnica de sexaje, tenemos que no genera costo alguno y la manipulación del animal solo ocasiona un mínimo estrés (Kirk, 1997).

6. CROMOSOMAS EN LAS AVES.

El genoma de las especies está contenido dentro de un número determinado de cromosomas; todos los cromosomas menos un par son llamados autosomas, los cuales provienen uno de la madre y el otro del padre, el par restante deriva de la misma manera pero es llamado cromosoma sexual (Nicholas, 1987).

En los mamíferos, los machos tienen los dos cromosomas sexuales diferentes llamándoseles así heterogaméticos y son designados por las letras XY, mientras las hembras tienen cromosomas homogaméticos XX (Nicholas, 1987).

Por el contrario en las aves el cromosoma heterogamético lo tienen las hembras y por esta razón para diferenciarlos se les designa con las letras ZW y los machos tienen cromosomas homogaméticos ZZ, estas letras o nombres no denotan ninguna característica especial de los cromosomas, solo indica que la hembra tiene el único cromosoma sexual diferente (Griffiths, 2000).

6.1. Evolución de los cromosomas sexuales

El origen de los cromosomas sexuales fue reconocido por primera vez en 1967 por el doctor Suzumo Ohno, quien observó que estos no emergían independientemente como cromosomas sexuales sino que se formaron de un par de autosomas (Griffiths, 2000).

Un par autosomal está formado por copias paterna y materna de un mismo cromosoma y son virtualmente idénticos; por el contrario, los cromosomas sexuales W y Z son muy distintos (Ohno, 1967).

La formación de los cromosomas sexuales se inició a partir de un organismo asexual que se transformó a cosexual el cual producía espermatozoides y huevos, siendo macho y hembra a la vez. En este estado todos sus cromosomas permanecen como autosomas. Luego comienza a darse la separación entre machos y hembras, es así que se inicia la formación de los cromosomas sexuales (Charlesworth, 1991).

Para esto es necesaria la presencia de 2 genes que controlen la fertilidad de la hembra (f) y del macho (m), cada uno de los cuales tiene una mutación que ha producido un alelo

inactivo (Charlesworth, 1996); es así que cada gen tendría un alelo fértil ó viril (v) y un alelo estéril (s) lo que se denotaría de la siguiente manera:

$$f^v, f^s, m^v \text{ y } m^s$$

Estas letras indican la dominancia de los alelos; esto significaría que la presencia de un único alelo, por ejemplo m^s podría originar que el macho sea infértil, aún si el m^v estuviera presente (Charlesworth, 1996).

Para evitar esto un alelo estéril como el f^s siempre debería estar ligado a un alelo fértil m^v ; para esto deben estar juntos en un mismo cromosoma. De esta manera el par de cromosomas que esto produce, serían los cromosomas sexuales (Charlesworth, 1996).

Los cromosomas sexuales de un individuo hembra deberían tener los siguientes alelos:

$$W: f^v m^s \text{ y } Z: f^s m^v$$

El macho debería tener alelos idénticos en cada uno de los Z cromosomas:

$$Z: f^s m^v \text{ y } Z: f^s m^v$$

Durante la producción de espermatozoides y huevos se da un intercambio de porciones similares de ADN entre los autosomas, lo que asegura que estos cromosomas siempre permanezcan similares (Charlesworth, 1996). Sin embargo esto no se produce en los cromosomas Z y W, porque se mezclarían los alelos f y m generando individuos estériles; esta carencia de intercambio de ADN, origina que ambos cromosomas sean diferentes debido a la mutación (Charlesworth, 1991; Griffiths, 2000).

A lo largo del tiempo el cromosoma Z ha permanecido con un complemento lleno de genes y continúa funcionando como antes; por el contrario el cromosoma W tiende a degenerarse y ha perdido la mayoría de sus genes, sin embargo ha ganado una gran proporción de ADN no codificado y se ha reducido de tamaño, es así que el Z es de cuatro a cinco veces más largo que el W y contiene casi todos los genes ligados al sexo conocidos (Griffiths, 2000).

El cromosoma W es llamado también microcromosoma, es heterocromático y contiene una gran proporción de secuencias repetidas de ADN (Stevens, 1997; Stephos y Arrighi,

1971), estas evolucionan rápidamente y son en su mayoría especie-específica (Ellegren y Sheldon, 1997).

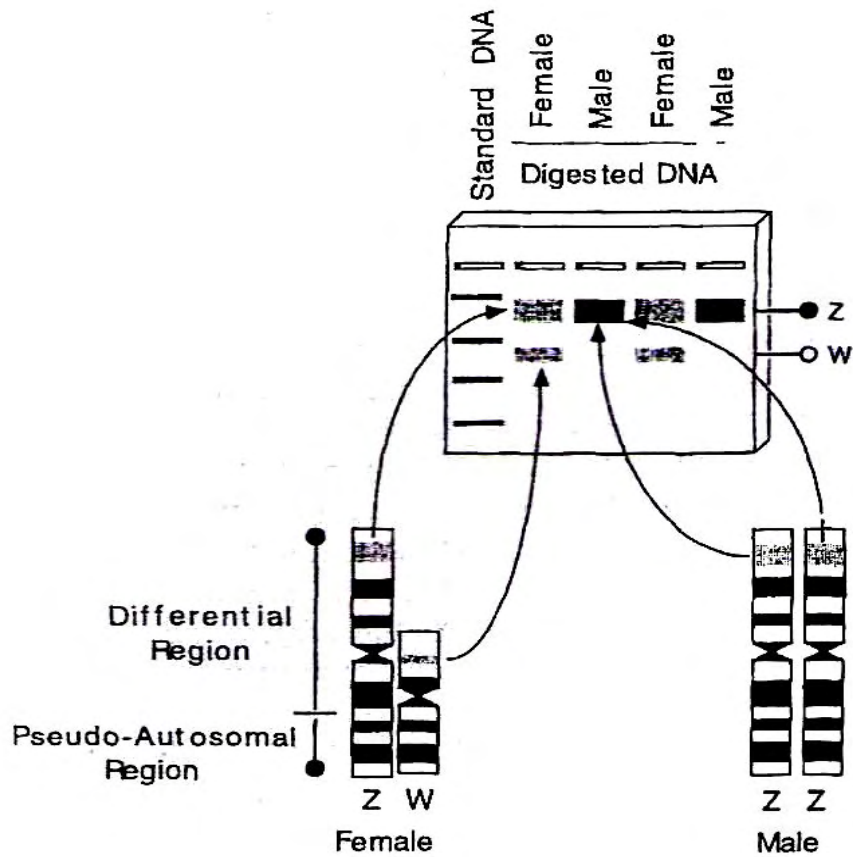


Fig. 12: Cromosomas sexuales de la hembra y el macho en las aves.

En este gráfico se observan los cromosomas heterogaméticos de las hembras (ZW) y los homogaméticos del macho (ZZ). Se aprecia al cromosoma W más pequeño, por lo que se le denomina microcromosoma (Fuente: Millar, 1996).

7. TÉCNICAS MOLECULARES USADAS EN DETERMINACIÓN DEL SEXO EN AVES

7.1. Generalidades:

7.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica utilizada para amplificar *in vitro* secuencias específicas de ácidos nucleicos (Aert *et al.*, 1998; Karcher, 1995). Este proceso de amplificación requiere de cantidades mínimas de ADN (microgramos) que pueden ser obtenidos de una simple molécula (Brown, 2000; Stracham y Read, 1999).

a. Metodología:

La PCR es una reacción *in vitro*, que es realizada por la mezcla apropiada de reactivos y su incubación posterior en un termociclador, equipo que permite la incubación a temperaturas que son variadas por intervalos de tiempo de una pre programada manera (Brown, 2000).

Los pasos básicos de la PCR son:

- **Desnaturalización:** Consiste en la desnaturalización del ADN por calentamiento a 94°C (Brown, 2000).
- **Alineamiento:** un par de oligonucleótidos es adicionado al ADN (cebadores) y la mixtura es enfriada entre 50 y 70°C, esto depende de la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos usados, a esta temperatura los oligonucleótidos se adhieren a sus sitios blanco (Brown, 2000; Aert *et al.*, 1998; Stracham y Read, 1999). La temperatura de fusión (T_m) se determina con la siguiente fórmula (Brown, 1994; Brown, 2000):

$$T_m = 4 (\#G + \#C) + 2 (\#A + \#T)$$

Esta estimación no es enteramente certera y la actual T_m de los cebadores puede ser baja o alta, especialmente si la secuencia incluye un número elevado de As y Ts (dando bajos T_m) o de Gs y Cs (dando elevados T_m) (Brown, 2000).

- **Extensión (Síntesis):** una ADN polimerasa termoestable es adicionada, la Taq polimerasa (ADN polimerasa tipo I, enzima de una bacteria termotolerante *Thermus aquaticus*), junto con un suministro de precursores de ADN (deoxinucleósidos trifosfatos: dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la mezcla es calentada a una temperatura óptima para la síntesis de ADN, entre 70 a 75°C (Brown, 2000; Stracham y Read, 1999). Los oligonucleótidos alineados en el ADN molde, actúan ahora como cebadores para la síntesis de nuevos polinucleótidos complementarios para las cadenas molde de ADN (Brown, 2000).

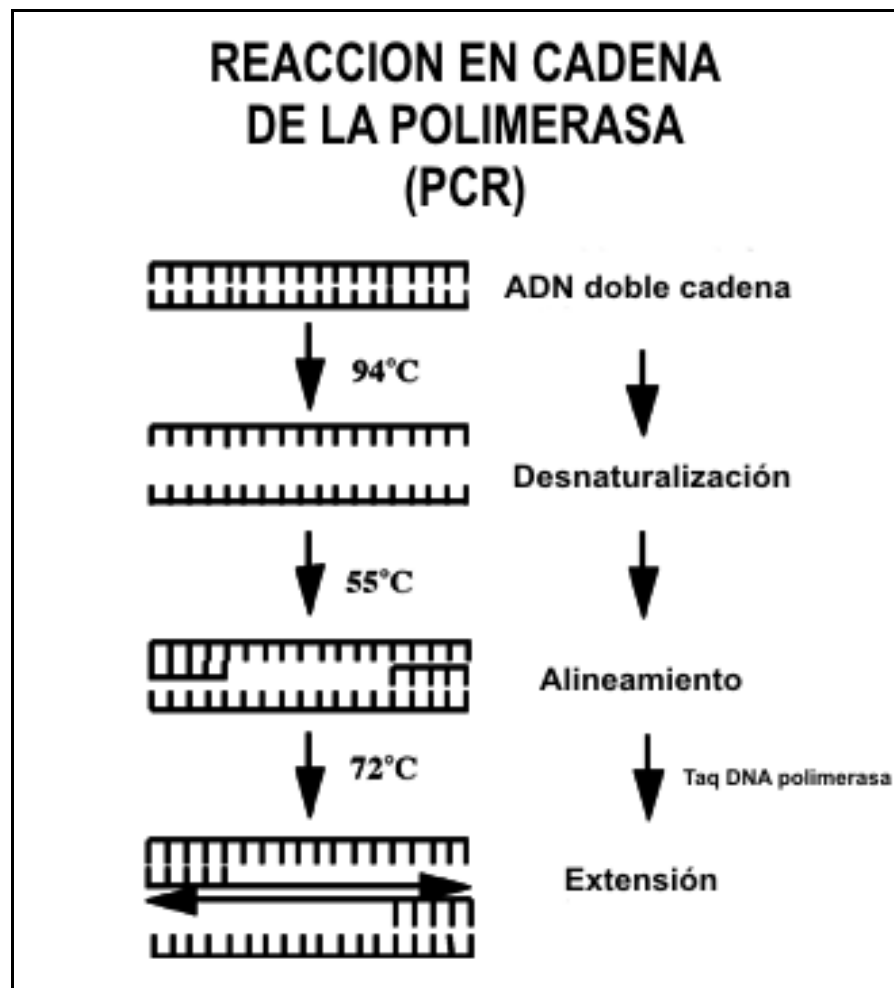


Figura 13. Fases de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión son repetidos de 25 a 30 veces, con un número de moléculas de ADN sintetizado que se dobla durante cada ciclo,

esta exponencial amplificación resulta en la síntesis de un gran número de copias de la secuencia de ADN flanqueado por el par de oligonucleótidos (Brown, 2000)

b. Componentes:

b.1. **Cebadores:** Los cebadores son el componente clave de la PCR y el acierto o falla de la amplificación depende mucho de su correcta designación (Brown, 2000). Citamos a continuación algunos puntos a tomar en cuenta en la designación de cebadores:

- La longitud determina la especificidad del cebador: si un cebador es corto este tiene una gran posibilidad de alinearse en más de un sitio en el ADN molde (Brown, 2000). La frecuencia aproximada de una particular secuencia esta representada por 4^n , donde n es la longitud de la secuencia del cebador (Brown, 2000). En la práctica los cebadores de 15 – 20 nucleótidos son usados para muchos propósitos (Brown, 2000; Stracham y Read, 1999), si los cebadores son mayores a 30 nucleótidos entonces los rangos de hibridización, que incrementan con la longitud, llegarán a ser un factor determinante y el completo alineamiento puede no ocurrir durante el tiempo permitido dentro de los ciclos termales (Brown, 2000).
- Un cebador no esta disponible para alinearse con su secuencia complementaria por haberse unido con el otro cebador: si el extremo 3- final de un cebador puede alinearse con algún sitio interno en el segundo cebador, entonces la extensión desde el extremo final 3- por la *Taq* polimerasa conduciría a la formación de dímero de cebador. La dimerización es promovida por las altas concentraciones de cebadores durante los ciclos iniciales de la PCR y durante esta etapa puede reducirse la síntesis de productos de amplificación debido a una competencia por la polimerasa (Brown, 2000). La reducción de la concentración de cebador causada por la dimerización puede causar una adicional disminución en la calidad del producto en la PCR (Brown, 2000).

b.2. **ADN molde:** La PCR puede ser realizada con casi cualquier preparación de ADN, aunque sales de acetato y SDS pueden reducir el rendimiento del producto (Brown, 2000). Si el ADN es disuelto en Solución tampón TE, cuando incrementamos la

cantidad de ADN en la PCR también incrementamos la cantidad de EDTA, el cual podría quelar al Mg^{2+} reduciendo la concentración efectiva de este ión en la reacción (Brown, 2000). Aunque ADN relativamente impuro puede ser usado en la PCR, algunas fuentes de ADN (muestras arqueológicas) pueden contener inhibidores de la Taq polimerasa los cuales impiden la realización de la PCR (Brown, 2000).

b.3. **Concentración de iones de Magnesio:** La interacción entre la Taq polimerasa y el ADN molde es magnesio dependiente (Brown, 2000). Este punto óptimo puede estar comprendido entre 1.0 mM y 5.0 mM Mg^{2+} , para determinarlo es necesario probar concentraciones de Mg^{2+} en distintas PCRs incrementando en 0.5 mM (Aert *et al.*, 1998; Brown, 2000).

7.1.2. Electroforesis:

La electroforesis es definida como la migración de partículas (iones y macromoléculas) cargadas a través de un medio estabilizante, bajo la influencia de un campo eléctrico (Karcher, 1995; Robinson y Lafleche, 2000), convencionalmente es llevada en una fase de solución (Brown, 1994). La agarosa y la poliacrilamida son los medios estabilizantes usados en electroforesis de macromoléculas (Karcher, 1995; Robinson y Lafleche, 2000), estos medios previenen disturbios mecánicos y de convección durante la electroforesis y sirven como un tamiz molecular (Karcher, 1995).

Las moléculas de ADN tienen carga eléctrica negativa, cuando dichas moléculas son colocadas en un campo eléctrico migrarán hacia el polo positivo este proceso es llamado electroforesis de ADN (Brown, 1994). En general los ácidos nucleicos migran a través del gel basados en su tamaño, con una pequeña influencia de la composición de bases a diferencia de las proteínas, que se separan a través de la matriz basadas en su tamaño, estructura y carga (Berger y Kimmel, 1987; Robinson y Lafleche, 2000; Sealey y Southern, 1982).

a. Electroforesis en geles de agarosa.

La agarosa es un polisacárido lineal extraído del agar, obtenido de varias especies de algas marinas rojas de los géneros *Gelidium* y *Gracilaria*. La unidad básica de la agarosa

es la agarobiosa, la cual forma largas cadenas de aproximadamente 400 unidades, con un promedio de masa molecular de 120 KDa (Robinson y Lafleche, 2000).

a.1. Propiedades de la agarosa:

- Tamaño de los poros: el promedio del tamaño de los poros en un gel de agarosa, varia con la concentración, pero esta comprendido entre 100-300 nm (Robinson y Lafleche, 2000), debido a esto permite fácil y eficientemente separar grandes fragmentos de ADN de doble cadena tan solo variando su concentración (Sealey y Southern, 1982).
- Temperatura de fusión y gelificación: la energía necesaria para fundir un gel de agarosa incrementa por medio de la concentración del gel, debido a esto, las temperaturas de gelificación y fusión son expresadas según la concentración del gel de agarosa siendo esto mas pronunciado en geles de concentraciones menores al 1% (Robinson y Lafleche, 2000).
- Resistencia del gel: una de los más importantes factores que contribuyen al éxito de la agarosa como un medio de anticonvección es su habilidad para exhibir alta solidez del gel a bajas concentraciones (menores al 6%) (Robinson y Lafleche, 2000). La resistencia del gel esta definida como la fuerza expresada en g/cm^2 que es necesario aplicar para romper el gel (Robinson y Lafleche, 2000).

a.2. Ventajas y desventajas de los geles de agarosa

- Forma macroporos los cuales permiten la rápida difusión de macromoléculas de alto peso molecular (1000 KDa) sin restricción significativa por el gel (Karcher, 1995; Robinson y Lafleche, 2000). Variando la concentración de la agarosa y/o el Solución tampón es posible separar satisfactoriamente ADN doble cadena en un rango de tamaño de aproximadamente 20 bp a 50 kb, fragmentos mas pequeños (resolución de 2 bp) no son posibles de separar mediante esta técnica (Robinson y Lafleche, 2000).
- La agarosa no es tóxica y a diferencia de la poliacrilamida no contiene productos dañinos derivados de la polimerización y no requiere de radicales libres para su polimerización (Robinson y Lafleche, 2000).

- Los geles de agarosa son termoreversibles (Robinson y Lafleche, 2000).
- El método es fácil y simple de realizar (Karcher, 1995).

b. Visualización de Fragmentos:

La técnica más común y rápida para la visualización de fragmentos de ADN en geles de agarosa es la fluorescencia usando bromuro de etidio (EtBr), el cual es un tinte fluorescente el cual detecta ADN de simple y doble cadena (Robinson y Lafleche, 2000). El EtBr se intercala entre las bases del ADN resultando en un incremento en el campo de la fluorescencia, cuando el complejo ADN-EtBr es expuesto a radiación ultravioleta (UV) (Karcher, 1995; Robinson y Lafleche, 2000). Mediante esta técnica se puede detectar cantidades mínimas de ADN (1 a 10 ng) en gel de agarosa (Karcher, 1995; Maniatis *et al.*, 1982; Robinson y Lafleche, 2000). La máxima cantidad de ADN que puede ser cargada en los pozos del gel de agarosa sin perder la definición de las bandas es cerca de 100 ng (Robinson y Lafleche, 2000).

7.1.3. Marcador Genético Gen CHD

Un marcador de ADN es cualquier región del genoma, heredable que presenta polimorfismo dentro de la población (Griffiths *et al.*, 1998). Griffiths *et.al.* (1996) identificaron el primer marcador de sexo en aves, el gen CHD (Chromodomain Helicase DNA binding protein). Este gen fue descubierto luego de realizar el sexaje del ave *Parus major* mediante la técnica del RAPDs, el producto obtenido por esta fue secuenciado y usando un programa de computadora encontraron que una pequeña porción de esta secuencia presentaba una remarcable similitud a una encontrada en el ratón: el gen CHD-1 (Delmas *et al.*, 1993), el cual es una proteína ligada al ADN que contiene tres dominios (Stokes y Perry, 1995):

- a. El que domina la organización de la cromatina es conocido como dominio Chromo (C).

- b. El que se encarga de la replicación, recombinación y reparación del ADN y de la transcripción y traducción del RNA, es denominado como dominio Helicase / ATPase (H).
- c. El que está involucrado en procesos de compactación, organización de la cromatina y regulación genética, es denominado dominio ADN binding (D).

Este gen CHD está presente en el cromosoma W de todas las aves, excepto en ratites como avestruz, emú y otros (Griffiths *et al.*, 1996; Ellegren, 1996). Este es un gen conservado en muchas especies, tanto en aves como en mamíferos; como por ejemplo, el grado de homología entre el gen CHD del pollo y el gen CHD del ratón es de 86% en nucleótidos y de 96% en el nivel de aminoácidos (Ellegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1996); este grado de similitud es extraordinario ya que los mamíferos y aves se separaron hace más de 200 millones de años (Ellegren y Sheldom, 1997).

El nivel de conservación en las aves de este gen es muy alto, existiendo solo un 5% de diferencia entre aves distantemente relacionadas como los guacamayos y el pollo (Griffiths, 2000); esto significa que si se designan cebadores para el pollo, estos también serían capaces de amplificar el CHD-W no solo en estas especies, sino también en la mayoría de aves (Griffiths, 2000).

Este gen está formado por segmentos de ADN codificados o exones, intercalados con ADN no codificado o intrones; la región que está ligada al cromosoma W es el exón (Griffiths, 2000). Los exones son regiones conservadas, las cuales no evolucionan rápidamente; por el contrario los intrones son regiones menos conservadas que durante el proceso evolutivo cambian en mayor proporción (Griffiths *et al.*, 1998).

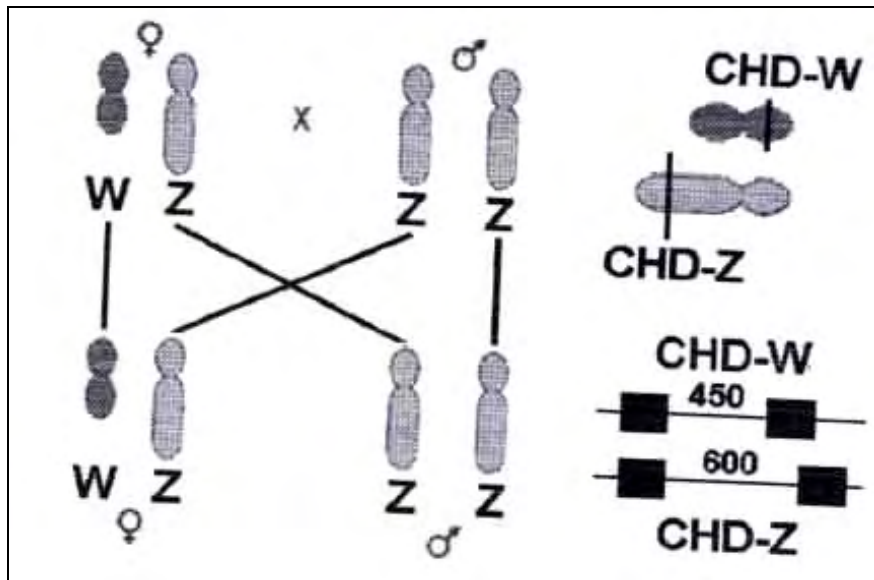


Fig. 14. Regiones conservadas en los cromosomas sexuales de la hembra y del macho.

El gen *CHD-W* y el gen *CHD-Z* tienen regiones conservadas o exones que en la figura están graficados como cuadrados negros, pero ambos difieren en las longitudes de las regiones no conservadas o intrones, los cuales tienen 450 y 600 bp respectivamente.

Luego se descubrió que este gen *CHD-W* tenía un homólogo en el cromosoma Z, al que se le llamó gen *CHD-NW* o *CHD-Z* (Griffiths, 2000). Ambos genes tienen pequeñas variaciones en su secuencia, pero con una elevada homología a nivel aminoacídico (Fridolfsson y Ellegren, 2000). Desafortunadamente este gen *CHD-Z* también es conservado por lo que podría amplificarse también con los cebadores empleados para el gen *CHD-W*; lo que podría producir error en el sexaje, pues se obtendrían productos idénticos y aparecerían en ambos sexos: machos (ZZ) y hembras (WZ). Debido a esta similitud entre los genes *CHD-W* y *CHD-Z*, se utilizó las regiones menos conservadas o intrones para la diferenciación ya que las longitudes de estas regiones difieren en ambas copias (Ellegren y Sheldon, 1997).

7.2. Polimorfismos de fragmentos amplificados al azar (RAPDs)

El procedimiento de este método está basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y que ha captado la atención de los científicos evolucionarios, debido a que revela fácilmente el polimorfismo del ADN. Consiste en que el ADN total de un organismo (en muy pequeña cantidad) es cebado o cortado por oligonucleótidos cortos y de secuencia arbitraria que ceban al azar en numerosos sitios de todo el genoma. Es así que si se presentan

2 sitios de corte en orientaciones opuestas y a distancia compatible con la amplificación por la enzima polimerasa, se producirá un fragmento amplificado (Ellegren y Sheldon, 1997).

Un simple oligonucleótido bajo estrictas condiciones puede amplificar 5 - 10 fragmentos de genoma al azar, mientras que fragmentos del DNA ligado al cromosoma W pueden ser identificados si se selecciona un gran número de oligonucleótidos cortos y sintéticos. La clave del uso de esta técnica en la determinación del sexo utilizando “pooles” de DNA de machos y hembras, radica en que los fragmentos amplificados del cromosoma W pueden estar restringidos solamente al pool femenino (Ellegren y Sheldon, 1997).

Lessells y Mateman (1998) utilizaron esta técnica para el sexaje de las especies aviares. Para poder determinar los primers adecuados probaron más de 30 cebadores, con lo cual lograron identificar el sexo en 7 especies de aves, mientras que no se encontraron cebadores para 3 especies luego de probar 50 cebadores en cada una. Dentro de las especies sexadas se realizaron investigaciones sobre la confiabilidad de los marcadores RAPDs para la determinación del sexo del *Parus major* y *Haemotopus ostrategus*, estas demostraron que:

- Si las condiciones de la reacción de PCR son variadas, puede producir la amplificación o no del ADN. Dentro de estas tenemos a la temperatura de alineamiento, la cual está en relación con la cantidad de guanina y citosina de los cebadores, siendo la T° ideal un rango de 36-40° C, temperaturas superiores evitarán la mayor parte de amplificaciones. Otro factor es la cantidad y calidad de ADN genómico utilizado. Un exceso de ADN genómico puede inhibir la amplificación (Lessells y Mateman, 1998). Otro elemento a tener en cuenta es el tipo de polimerasa utilizado y la concentración de cloruro de magnesio (Mg Cl₂), ya que se ha descrito la aparición de polimorfismo en función de la polimerasa utilizada (Cushwa y Medrano, 1996); en cuanto a la concentración de Mg Cl₂ se indica que si esta es elevada favorecerá una mayor amplificación de bandas (Ambady *et al.*, 1996). Por lo tanto la amplificación de marcadores RAPDs es especialmente sensible, ya que pequeñas variaciones conllevan a la aparición o desaparición de bandas (Cushwa y Medrano, 1996).
- Se estimó la presencia de alelos nulos en el fragmento específico de hembra, de un 0% en el *Parus major* y de un 0.6% en el *Haemotopus ostrategus*, los cuales podrían luego ser erróneamente asignados como machos (Lessells y Mateman, 1998). Esto es debido a que

existe mutaciones que pueden causar la existencia de estos alelos nulos no amplificados en hembra.

- Que la banda específica de hembra en el *Parus major* puede ser secuenciada y subsecuentemente amplificada usando cebadores específicos.
- Poblaciones geográficas pueden diferir en la secuencia de nucleótidos exacta y por consiguiente en la amplificación del fragmento específico de hembra. Sin embargo, en el *Parus major*, este fragmento se presenta en individuos de un rango geográfico extenso (Lessells y Mateman, 1998).
- La relativa intensidad de las bandas en el *Parus major* es consistente a través de individuos.

Sin embargo la principal desventaja de esta técnica es que los marcadores RAPDs que se hallan o que se hallaron son especie-específicos y por lo tanto, el costo de escoger los cebadores es caro si se buscan marcadores universales del sexo en aves silvestres.

Tabla 2: Especies aviares para las cuales los cebadores de tipo RAPDs produjeron fragmentos específicos de hembra

ESPECIES	No de primers	secuencia de primers probados	longitud de fragmentos específico de hembra (kb)	Porcentaje medio de C+G en primers probados	No de machos conocidos : hembras conocidas
Jacana	43 (22)	5'- GGTCCTGAC- 3'	0.76	60%	19:14
<i>Jacana spinosa</i>					
Oystercatcher	69 (49)	5'- CCGGCCGTCA- 3'	0.55	60%	9:10
<i>Haematopus ostralegus</i>					
European bee-eater	67 (63)	5'- AGGGCCGTCT- 3'	0.42	60%	9:10
<i>Merops apiaster</i>					
European robin	40 (32)	5'- TCGGCGATAG- 3'	0.28	60%	9:09
<i>Erithacus rubecula</i>					
Seychelles magpie robin	42 (42)	5'- TCCGCTCTGG- 3'	0.44	60%	9:04
<i>Copsychus sechellarum</i>					
Seychelles warbler	12 (3)	5'- GGGTAACGCC- 3'	1.02	60%	5:05
<i>Acrocephalus sechellensis</i>					
Blackcap	67			60%	
<i>Sylvia atricapilla</i>					
Pied flycatcher	48			60%	
<i>Ficedula hypoleuca</i>					
Collared flycatcher	25			60%	
<i>Ficedula albicollis</i>					
Great tit	5 (2)	5'- ATCCTTTCGC- 3'	0.94	50%	5:07
<i>Parus major</i>					

Fuente: Lessells y Mateman, 1997.

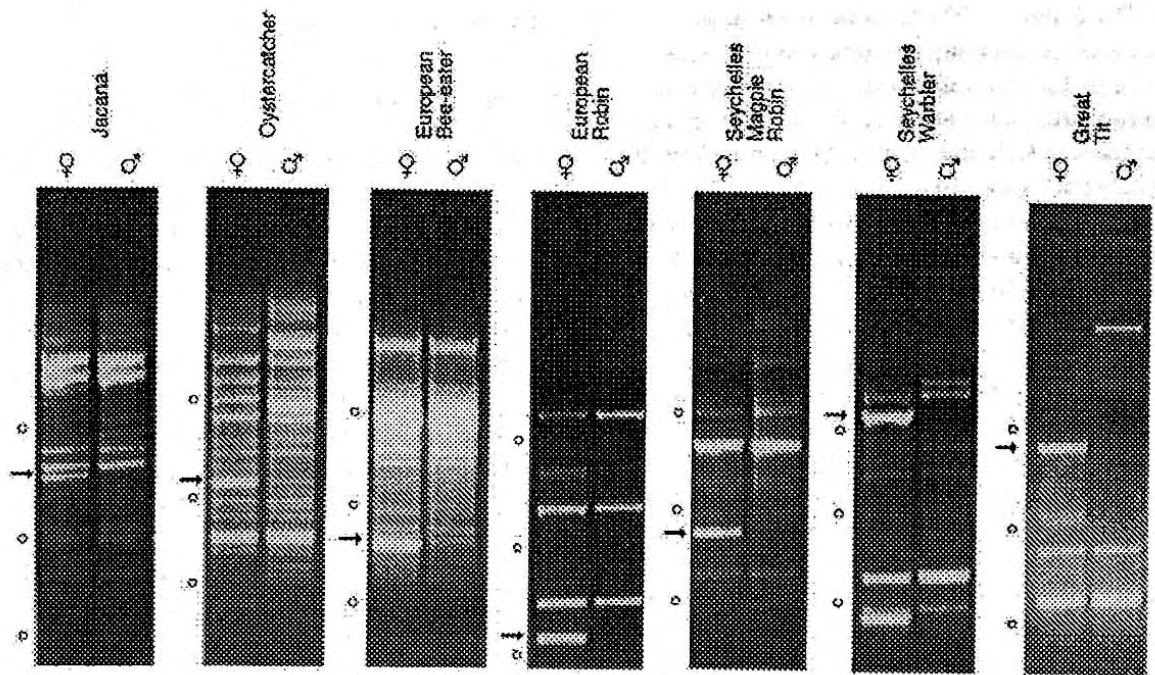


Fig. 15. Perfiles de RAPDs que permiten la determinación del sexo en 7 especies de aves.

En la figura se muestran los pares de columnas adyacentes que son amplificaciones de aves hembras (lado derecho de la columna) y machos (lado izquierdo). Las flechas indican el fragmento específico de hembra (Fuente: Lessells y Mateman, 1997).

7.3. polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción mediante uso de técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP) (cebadores p2 y p3).

Esta técnica esta basada en la PCR ; en este proceso una muestra de ADN es amplificado con cebadores, luego al producto obtenido se le procede a añadir una enzima especifica , la cual rompe la hebra de ADN en un punto concreto y por consiguiente produce fragmentos de distinto tamaño, lo que se evidencia en un gel de agarosa.

Los cebadores pueden ser desarrollados para amplificar regiones conservadas del gen por lo que una particular pareja de cebadores amplificaría un fragmento corto de ambas copias del gen CHD (CHD-W y CHD-Z) en muchas diferentes especies. Para esto los segmentos deben diferir levemente en la secuencia; asimismo la enzima de restricción que corta el CHD-W pero no el CHD-Z mostrará 3 fragmentos diferentes en hembras (el fragmento no cortado CHD-Z y los dos fragmentos pequeños del CHD-W); y un único fragmento en machos. La misma enzima no identifica las copias en todas las especies pero unas pocas enzimas parecen comunes a un rango de familias (Ellegren y Sheldon, 1997).

Una aplicación de este método fue realizado por Griffiths y Tiwari (1995), con una especie de guacamayo que se encontraba en peligro de extinción, el *Cyanopsitta spixii*; para poder realizarla se necesito acceder a la librería genómica Stratagene (Cambs, UK), para obtener la secuencia genómica del Guacamayo Jacinto (*Anodorhynchus hyacinthinus*) del cual se aisló al homólogo del CHD-W, el CHD-Z. Esto permitió diseñar cebadores para amplificar una región de 104 bp de ambos CHD-W y CHD-Z del ADN del Spix's Macaw (*Cyanopsitta spixii*). La determinación de la secuencia reveló que el CHD-W produjo un producto de PCR que poseía un sitio para la enzima de restricción DdeI, la cual fue lacking en el CHD-Z. Es por esto que luego de la amplificación por PCR y de la aplicación de la enzima al ADN del guacamayo Spix, el producto que se obtuvo fue de 104 pares de bases (bp), lo que indicó que este era un ave macho; mientras que el secuenciamiento del genoma de una hembra genera dos productos, uno de 104 bp y otro de 73 bp. Los cebadores que se utilizaron fueron el P3 (5' a 3') AGATATTCCGGATCTGATAGTGA y el P2 TCTGCATCGCTAAATCCTTT (Griffiths y Tiwari, 1995).

La presencia del CHD-Z en ambos sexos actúa como un control para asegurar que la amplificación de la PCR ha sido satisfactoria.

Otra aplicación de esta técnica fue la realizada en guacamayos de la especie *Ara militaris*, para la cual se seleccionaron marcadores, los cuales fueron utilizados para el sexaje de otras 4 especies de guacamayos de manera satisfactoria, este es el primer reporte de sexaje molecular en guacamayos del género *Ara* (Bermúdez *et al.*, 2002).

7.4. Reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos. (P2 y P8)

Esta técnica esta basada en el uso de los 2 genes CHD, sin embargo no requiere enzimas de restricción para separar los productos de PCR y es más rápida, menos costosa y más simple.

La prueba emplea 2 cebadores de PCR los cuales amplifican regiones conservadas o exónicas o exones pero también una región no conservada o intrón en ambos genes CHD-W y CHD-Z.

Los intrones son no codificados, ello son menos conservados y sus longitudes usualmente difieren entre los genes. Como resultado, los productos de PCR varían en tamaño por lo que el gel de electroforesis revela una banda en el macho y dos bandas en la hembra.

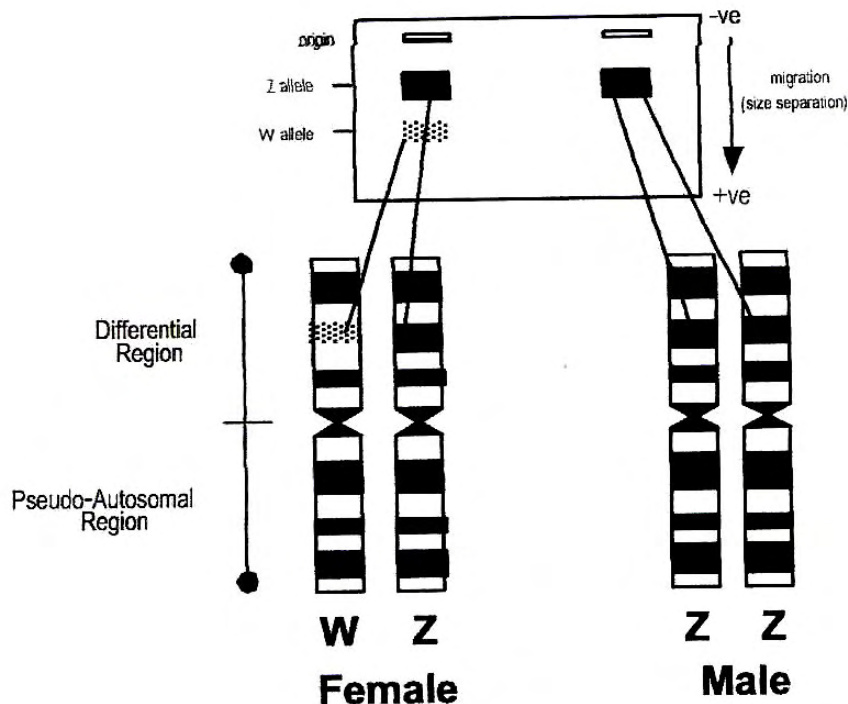


Fig. 16: Detección de los genotipos de los cromosomas ZW y ZZ durante la técnica de sexaje por análisis de ADN. La copia del gen del cromosoma W es más pequeña que la copia del cromosoma Z. Con la siguiente amplificación de los genes por la PCR, estos son colocados en la carga negativa final de un medio de agarosa con una corriente eléctrica corriendo a través de esta. Todos los fragmentos del gen migran hacia el polo positivo. El fragmento pequeño (del cromosoma W) se mueve más rápido que el fragmento del cromosoma Z. Los fragmentos se deberán ver en dos diferentes posiciones si el individuo es hembra. En el macho hay dos copias del gen Z los cuales son del mismo tamaño, por lo cual se sobreponen uno encima del otro en un medio de agarosa.

Ambos genes en los pollos domésticos tienen un tamaño de 5000 pb (Griffiths y Korn, 1997), los cebadores P2 y P3 descritos por Griffiths y Tiwari (1995) brindaron las bases de las cuales se buscaron intrones dentro de estos genes. El secuenciamiento reveló que el cebador P2 fue posicionado 132 bp por debajo de un intrón. Un alineamiento de la secuencia del gen CHD-1 del ratón y el CHD-Z del pollo fueron usados para diseñar un nuevo cebador de avanzada (P8) el cual junto con el cebador P2 podrían amplificar una región de los genes CHD los cuales incluirían el intrón (Griffiths *et al.*, 1997). La secuencia de estos primers o cebadores fueron probados en el ave pinzón zebra y el pollo.

Una aplicación de esta técnica por Griffiths *et al.*, (1997) quienes la utilizaron en 28 especies de aves de las cuales se lograron sexar 27 de estas, excepción del avestruz (*Struthio camelus*) ya que esta técnica no permite sexar ratites debido a que los cromosomas W y Z son morfológicamente similares a los autosomas y muestran pequeña divergencia o patrones de bandas (Ansari *et al.*, 1998; Tagaki *et al.*, 1972). Los productos obtenidos de la PCR fueron corridos en un gel de agarosa el 3% en el que se observó 2 bandas en las hembras y 1 banda en el macho (Griffiths *et al.*, 1997).

Tabla 3. Especies que fueron sexadas mediante el uso de cebadores P2 y P8.

Clasificación basada en Siblev *et al.* (1988)

Orden	Familia	Especie
Struthioniformes	Struthionidae	ostrich (<i>Struthio camelus</i>) *
Galliformes	Phasianidae	domestic chicken (<i>Gallus domesticus</i>)
Anseriformes	Anatidae	mute swan (<i>Cygnus olor</i>)
Coraciiformes	Alcedinidae	laughing kookaburra (<i>Dacelo novaeguineae</i>)
	Meropidae	European bee-eater (<i>Merops apiaster</i>)
Psittaciformes	Psittacidae	Spix's macaw (<i>Cyanopsitta spixii</i>)
		crimson rosella (<i>Platycercus elegans</i>)
		glossy black-cockatoo (<i>Calyptorhncus lathami</i>)
Apodiformes	Apodidae	swift (<i>Apus apus</i>) †
Strigiformes	Strigidae	tawny owl (<i>Strix aluco</i>) †
		morepork (<i>Ninox novaeselandiae</i>) †
Columbiformes	Columbidae	rock pigeon (<i>Columba livia</i>)
Gruiformes	Otididae	houbara bustard (<i>Chlancydotis undulata</i>)
Ciconiiformes	Burhinidae	bush stone-curlew (<i>Burhinus grallarius</i>)
	Laridae	lesser black-backed gull (<i>Larus fuscus</i>)
	Alcidae	black guillimot (<i>Cepphus grylle</i>)
	Accipitridae	marsh harrier (<i>Circus aeruginosus</i>)
	Falconidae	kestrel (<i>Falco tinmunculus</i>)
Passeriformes	Maluridae	Superb fairy-wren (<i>Malurus cyaneus</i>)
	Pardalotidae	white browed scrubwren (<i>Sericornis frontalis</i>)
		brown thornbill (<i>Acanthiza pusilla</i>)
	Sylviidae	african marsh warbler (<i>Acrocephalus bacticatus</i>)
	Corvidae	white winged chough (<i>Corcovus melanorhamphos</i>)
	Callaeatidae	North Island kokako (<i>Callaeas cinerea</i>)
	Sturnidae	starling (<i>Sturnus vulgaris</i>)
	Paridae	blue tit (<i>Parus caeruleus</i>)
	Passeridae	zebra finch (<i>Taeniopygia guttata</i>)

* : no pudieron ser sexados

† : sexados usando gel de acrylamida

Fuente: Griffiths *et al.*, 1998.

Ratón	CHD1	CTCCCGAGAA TGAGAAACTG TGCAAAGCAG N (?) ATAAGTTTCA ATGGAAGTGA AGGGAGGCCG
Pollo	CHD-W	...T...A.....A.....N (178)....C...C...T.....A.....AT..C
Pollo	CHD-ZG.....A.....N (161)....C...C...T.....G.....A...A..C
Zebra Finch	CHD-W	T..G...A...G.....A.....N (207)....C...C...T.....AA..AC
Zebra Finch	CHD-Z	...T...A.....A.....N (171)....T...C.....C.....A...C
Primer P8		CTCCAAGGA TGAGRAAYTC
Ratón	CHD1	AGTAGAAGCA GGAGATATTC TGGATCTGAT AGTGATTCAA TCTCGGAAAG GAAACGGCCG
Pollo	CHD-WG.....A.....C.....A.....A.....A...A
Pollo	CHD-ZG.....A.....C..C.....A..A.....A.....A
Zebra Finch	CHD-WG...G...A.....C..GG.....A.....A.....A...A
Zebra Finch	CHD-ZG...T...A.....C.....C..C.....A.....A...A...A
Ratón	CHD1	AAGAAACGTG GGCGACCCCG CACTATCCCT CGGGAGAATA TTAAAGGATT TAGTGATGCG GA
Pollo	CHD-W	...A.....A.....A...A.....T...C...T...A...C.....A
Pollo	CHD-Z	...A...G.....AA...T...A...C...T.....A...A.....A
Zebra Finch	CHD-W	...A.....AA...G...A.....T.....A...A.....C.....A
Zebra Finch	CHD-Z	...A.....AA...A...A.....T.....A...A.....A
Primer P2	TTTCCTAA ATCGCTACGT CT

Fig. 17. Secuencia de nucleótidos de una región de los genes CHD en el ratón, pollo y del pinzón zebra.

Las secuencias ilustradas incluyen porciones de dos exones conservados, mientras el pobremente conservado intrón ha sido removido, pero el N (nucleótido) y un número indican el tamaño de esta región. Los cebadores P2 y P8 también se muestran. En el cebador P8 el código R=A/G y Y=T/C. Los puntos suspensivos indican identidad con la secuencia del ratón (Fuente: Griffiths et al., 1998).

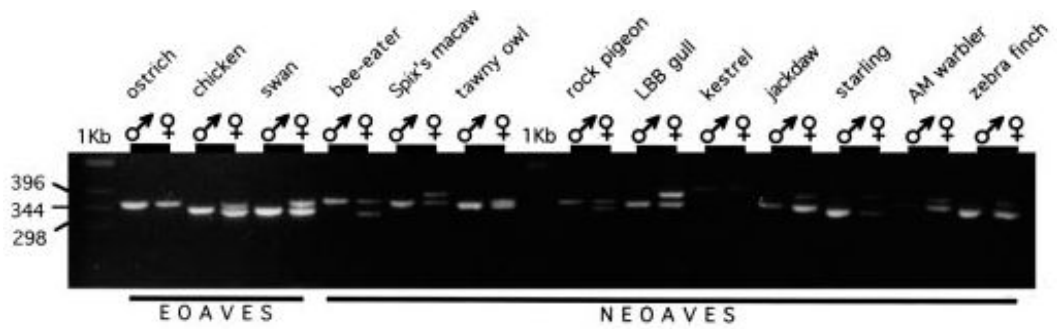


Fig. 18. Identificación del sexo mediante la PCR usando cebadores P2 y P8.

Se indica el sexo conocido de cada individuo; las aves con 2 bandas son hembras y aquellas con una banda son machos. El nombre de las especies esta indicado en la parte superior de la figura (**Fuente: Griffiths et al., 1998**).

Otro trabajo realizado con esta técnica fue el realizado por Miyaki *et al.* (1998) quienes utilizaron ambos cebadores (P2 y P8) en un amplio rango de loros para confirmar la aplicabilidad de esta técnica de sexaje en la que también participaron tucanes y crácidas. Con este trabajo se demostró que los loros hembras de 31 especies (15 géneros diferentes) evidenciaron 2 bandas mientras que en los machos solo un fragmento pequeño fue visualizado; la diferencia de tamaño de los 2 productos de PCR de las hembras en loros y tucanes pudieron ser separados en gel de agarosa; por el contrario, los individuos de las 8 especies de crácidas pudieron ser sexados en gel de poliacrilamida, evidenciando igualmente el mismo tipo de bandas que en las anteriores (Miyaki *et al.*, 1998).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Lugar de Estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el Patronato del Parque de Las Leyendas “Felipe Benavides Barreda” y en un zocriadero particular. El procesamiento y el análisis de las muestras se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Virología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM).

1.2. Animales:

Para la estandarización de la prueba de ADN se trabajó con 31 guacamayos del género *Ara* previamente sexados mediante métodos tradicionales (sexaje quirúrgico, sexaje por historia y necropsia) como se observan en las tablas 4 y 5. Además se utilizaron 28 aves de sexo desconocido (Tabla 6) para la aplicación de la técnica una vez estandarizada.

Tabla 4. Especies del estudio previamente sexadas

ESPECIE	NOMBRE COMÚN	DISTRIBUCIÓN	ESTATUS (a)	ORIGEN (b)	MACHOS	HEMBRAS	TOTAL
<i>Ara ararauna</i>	Guacamayo azul y amarillo	Neotropical	NL	C	7	4	11
<i>Ara macao</i>	Guacamayo rojo	Neotropical	VU	C	3	4	7
<i>Ara chloroptera</i>	Guacamayo rojo y verde	Neotropical	VU	C	5	2	7
<i>Ara militaris</i>	Guacamayo verde o militar	Neotropical	VU	C	1	1	2
<i>Propyrrhura couloni</i>	Guacamayo cabeza azul	Neotropical	VU	C	1	3	4
TOTAL					17	14	31

NL: No listado en la Lista Roja de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre de la UICN (Unión Mundial para la Conservación)

VU: Situación Vulnerable.

C: Cautiverio (no necesariamente nacidos en cautiverio).

Fuente: D.S. No. 034-2004-AG.

Tabla 5: Métodos de sexaje de las aves empleadas para la estandarización de la prueba de ADN

IDENTIFICACION (a)	ESPECIE	METODO DE SEXAJE			SEXO	PROCEDENCIA
		PREVIO (b)				
		SQ	H	N		
1A	<i>Ara ararauna</i>	X			Hembra	PATPAL (*)
2A	<i>Ara ararauna</i>	X		X	Macho	PATPAL
3A	<i>Ara ararauna</i>	X			Macho	PATPAL
4A	<i>Ara ararauna</i>	X			Macho	PATPAL
5A	<i>Ara ararauna</i>	X			Macho	PATPAL
6A	<i>Ara ararauna</i>	X			Hembra	PRIVADO (**)
7A	<i>Ara ararauna</i>	X			Macho	PRIVADO
8A	<i>Ara ararauna</i>	X			Hembra	PRIVADO
9A	<i>Ara ararauna</i>	X			Macho	PRIVADO
10A	<i>Ara ararauna</i>	X			Macho	PRIVADO
11A	<i>Ara ararauna</i>	X			Hembra	PRIVADO
12M	<i>Ara macao</i>	X			Hembra	PATPAL
13M	<i>Ara macao</i>	X			Hembra	PRIVADO
14M	<i>Ara macao</i>	X			Macho	PRIVADO
15M	<i>Ara macao</i>		X		Macho	PRIVADO
16M	<i>Ara macao</i>		X		Hembra	PRIVADO
17M	<i>Ara macao</i>	X			Hembra	PRIVADO
18M	<i>Ara macao</i>	X			Macho	PRIVADO
19C	<i>Ara chloroptera</i>		X		Hembra	PATPAL
20C	<i>Ara chloroptera</i>		X		Macho	PATPAL
21C	<i>Ara chloroptera</i>	X			Macho	PATPAL
22C	<i>Ara chloroptera</i>	X			Macho	PATPAL
23C	<i>Ara chloroptera</i>	X			Macho	PATPAL
24C	<i>Ara chloroptera</i>	X			Hembra	PRIVADO
25C	<i>Ara chloroptera</i>	X			Macho	PRIVADO
26MI	<i>Ara militaris</i>		X		Macho	PATPAL
27MI	<i>Ara militaris</i>		X		Hembra	PATPAL
28P	<i>Prophyrhura couloni</i>	X			Hembra	PATPAL
29P	<i>Prophyrhura couloni</i>	X			Macho	PATPAL
30P	<i>Prophyrhura couloni</i>	X			Hembra	PATPAL
31P	<i>Prophyrhura couloni</i>	X			Hembra	PATPAL

(a): Las aves que se les designa con la letra A pertenecen a la especie *Ara ararauna*; las letras M, C, MI y P corresponden a las especies: *Ara macao*, *Ara chloroptera*, *Ara militaris* y *Prophyrhura couloni*, respectivamente.

(b): **SQ**: Sexaje Quirúrgico; **H**: Historia; **N**: Necropsia

(*) **PATPAL**: Patronato del Parque de las Leyendas

(**): **PRIVADO**: Perteneciente a zoocriadero.

Tabla 6. Lista y Procedencia de las especies de los guacamayos del estudio sin sexo conocido

Identificación	Especie	Procedencia
1	<i>Ara ararauna</i>	PATPAL (*)
2	<i>Ara ararauna</i>	PATPAL
3	<i>Ara macao</i>	PATPAL
4	<i>Ara macao</i>	PATPAL
5	<i>Ara macao</i>	PATPAL
6	<i>Ara macao</i>	PATPAL
7	<i>Ara macao</i>	PRIVADO (**)
8	<i>Ara macao</i>	PATPAL
9	<i>Ara chloroptera</i>	PATPAL
10	<i>Ara chloroptera</i>	PATPAL
11	<i>Ara chloroptera</i>	PATPAL
12	<i>Ara militaris</i>	PATPAL
13	<i>Ara militaris</i>	PATPAL
14	<i>Ara militaris</i>	PATPAL
15	<i>Ara militaris</i>	PATPAL
16	<i>Ara militaris</i>	PATPAL
17	<i>Ara militaris</i>	PATPAL
18	<i>Propyrrhura couloni</i>	PATPAL
19	<i>Propyrrhura couloni</i>	PATPAL
20	<i>Propyrrhura couloni</i>	PATPAL
21	<i>Propyrrhura couloni</i>	PATPAL
22	<i>Propyrrhura couloni</i>	PATPAL
23	<i>Propyrrhura couloni</i>	PATPAL
24	<i>Propyrrhura couloni</i>	PATPAL
25	<i>Propyrrhura couloni</i>	PATPAL
26	<i>Propyrrhura couloni</i>	PATPAL
27	<i>Propyrrhura couloni</i>	PATPAL
28	<i>Propyrrhura couloni</i>	PATPAL

(*) **PATPAL**: Patronato del Parque de las Leyendas.

(**) **PRIVADO**: Perteneciente a zoocriadero.

2. METODOLOGÍA

2.1. Procedimientos:

2.1.1. Colección de muestras.

Se colectó 0.2 ml. de sangre por medio de punción de la vena braquial de cada ave y se colocó en tubos con anticoagulante (EDTA) y se almacenó en refrigeración hasta su posterior procesamiento.

2.1.2. Extracción de ADN.

Se extrajo ADN genómico de las muestras de sangre mediante Wizard DNA Isolation kit (PROMEGA) siguiendo el protocolo de extracción (Promega, 2000). Se determinó la calidad (tamaño del fragmento y la cantidad o concentración del ADN) por comparación con diluciones seriadas de un marcador de peso molecular 1 DNA hind III (Amresco) a una concentración de 50 ng/ul en un gel de agarosa al 0.8%.

2.1.3. Amplificación de fragmentos del gen CHD.

Se amplificó un fragmento del gen CHD mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores (Griffiths *et al.*, 1998):

P2: 5' - TCTGCATCGCTAAATCCTTT - 3'

P8: 5' - CTCCAAGGATGAGRAAAYTG - 3' R = A / G, Y = T / C.

Se procedió a optimizar las condiciones y ciclos termales para amplificación de un fragmento de aproximadamente 300 a 400 bp (pares de bases) mediante PCR partiendo de las condiciones descritas por Griffiths *et al.* (1998).

La optimización de la PCR se realizó en una solución final de 10 µL. conteniendo 20 - 50 ng. de ADN genómico, 1 - 5 mM de MgCl₂ (Promega), 2 mM de desoxirribonucleótidos (Promega), 5 - 20 pmol. de cada cebador (Sigma), 0.5 - 1.5 U de

Taq-polimerasa (Promega) y 1 X de Buffer de PCR (Promega); realizándose los siguientes ciclos termales: 1 ciclo de denaturación inicial de 95° C por 5'; y 30 ciclos de 95° C por 30'', 41 – 51° C por 30'' y 72° C por 30''.

2.1.4. Separación y visualización de fragmentos amplificados

Los productos de PCR fueron diluidos con Buffer Loading Gel 6X (Promega) a razón de 5:1 y fueron separados en un gel de agarosa (Promega) al 3% durante 4 horas, a 120 Voltios, con solución tampón TBE 0.5 X (Tris borato EDTA) utilizando un sistema de electroforesis horizontal (Hybaid). Se colocó en cada pozo del gel un volumen final de 12 µL. de la dilución del producto de PCR. El gel incluyendo los productos de PCR, fueron visualizados mediante fluorescencia con bromuro de etidio a través de la luz ultravioleta.

La visualización de 2 fragmentos en el gel de agarosa al 3% indicaría que el sexo del individuo es hembra, y la observación de 1 fragmento que el individuo es macho, de acuerdo a lo descrito por Griffiths y Tiwari (1995).

IV. RESULTADOS

Se logró la extracción de material genético (ADN) de 59 (100%) muestras de sangre de 5 especies de guacamayos colectadas en una concentración que varía entre 25 a 50 ng./ μ L.

Se logró estandarizar la prueba de PCR, en el Laboratorio de Virología y Genética Molecular de la F.M.V. de la U.N.M.S.M., para la amplificación de un fragmento de 300 - 400 bp del gen CHD en un volumen final de 10 μ L para lo cual las condiciones finales de reacción fueron: 50 ng. de ADN genómico, 2 mM de $MgCl_2$ (Promega), 2 mM de desoxirribonucleótidos (Promega), 20 pmol. de cada cebador (Sigma), 1 U de Taq-polimerasa (Promega), 1 X de Buffer de PCR (Promega); con un ciclo inicial de denaturación de 95° C x 5', el cual fue seguido de 30 ciclos de 95° C x 30'', 47° C x 30'' y 72° C x 30'' en Termociclador Perkin elner 4800. Bajo estas condiciones los cebadores P2 y P8 se mostraron eficaces para determinar el sexo de guacamayos silvestres.

La visualización en gel de agarosa (3%) de los productos de la PCR utilizando los cebadores P2 y P8 determinó la presencia de dos fragmentos de 300 a 400 pares de bases en 14 (100%) guacamayos hembras, sexadas por pruebas de sexaje convencional (Tabla 7). En el grupo de los guacamayos machos la visualización en gel de agarosa (3%) de los productos de la PCR utilizando los cebadores P2 y P8 determinó la presencia de un fragmento de 300 a 400 pares de bases en 17 (100%) individuos sexados por pruebas de sexaje convencional (Tabla 7). De esta manera, se obtuvo el 100% de compatibilidad entre los resultados obtenidos por métodos de sexaje molecular y otros métodos de sexaje.

En el grupo de 28 aves de sexo desconocido se produjo la visualización de 2 fragmentos en 15 de estas aves y de un fragmento en las 13 aves restantes (Tabla 8), estos fragmentos obtenidos tuvieron el mismo peso molecular que los fragmentos obtenidos en el grupo de aves empleadas para la estandarización de la prueba.

TABLA 7. Sexo obtenido por ADN en el grupo de especies con sexo previamente conocido.

AVE (a)	ESPECIE	SEXO OBTENIDO POR ADN (b)	
		MACHO	HEMBRA
1A	<i>Ara ararauna</i>		X
2A	<i>Ara ararauna</i>	X	
3A	<i>Ara ararauna</i>	X	
4A	<i>Ara ararauna</i>	X	
5A	<i>Ara ararauna</i>	X	
6A	<i>Ara ararauna</i>		X
7A	<i>Ara ararauna</i>	X	
8A	<i>Ara ararauna</i>		X
9A	<i>Ara ararauna</i>	X	
10A	<i>Ara ararauna</i>	X	
11A	<i>Ara ararauna</i>		X
12M	<i>Ara macao</i>		X
13M	<i>Ara macao</i>		X
14M	<i>Ara macao</i>	X	
15M	<i>Ara macao</i>		X
16M	<i>Ara macao</i>	X	
17M	<i>Ara macao</i>		X
18M	<i>Ara macao</i>	X	
19C	<i>Ara chloropthera</i>		X
20C	<i>Ara chloropthera</i>	X	
21C	<i>Ara chloropthera</i>	X	
22C	<i>Ara chloropthera</i>	X	
23C	<i>Ara chloropthera</i>	X	
24C	<i>Ara chloropthera</i>		X
25C	<i>Ara chloropthera</i>	X	
26MI	<i>Ara militaris</i>	X	
27MI	<i>Ara militaris</i>		X
28P	<i>Prophyrhura couloni</i>		X
29P	<i>Prophyrhura couloni</i>	X	
30P	<i>Prophyrhura couloni</i>		X
31P	<i>Prophyrhura couloni</i>		X

(a): Las aves que se les designa con la letra A pertenecen a la especie *Ara ararauna*; las letras M, C, MI y P corresponden a las especies: *Ara macao*, *Ara chloropthera*, *Ara militaris* y *Prophyrhura couloni*, respectivamente.

(b): A los individuos machos les corresponde la amplificación de un fragmento y a los individuos hembras les corresponde la amplificación de 2 fragmentos comprendidos entre 400 y 300 bps.

MPM 1A 27MI 19C 21C 5 A 12M 16M 17M 29P 28P MPM

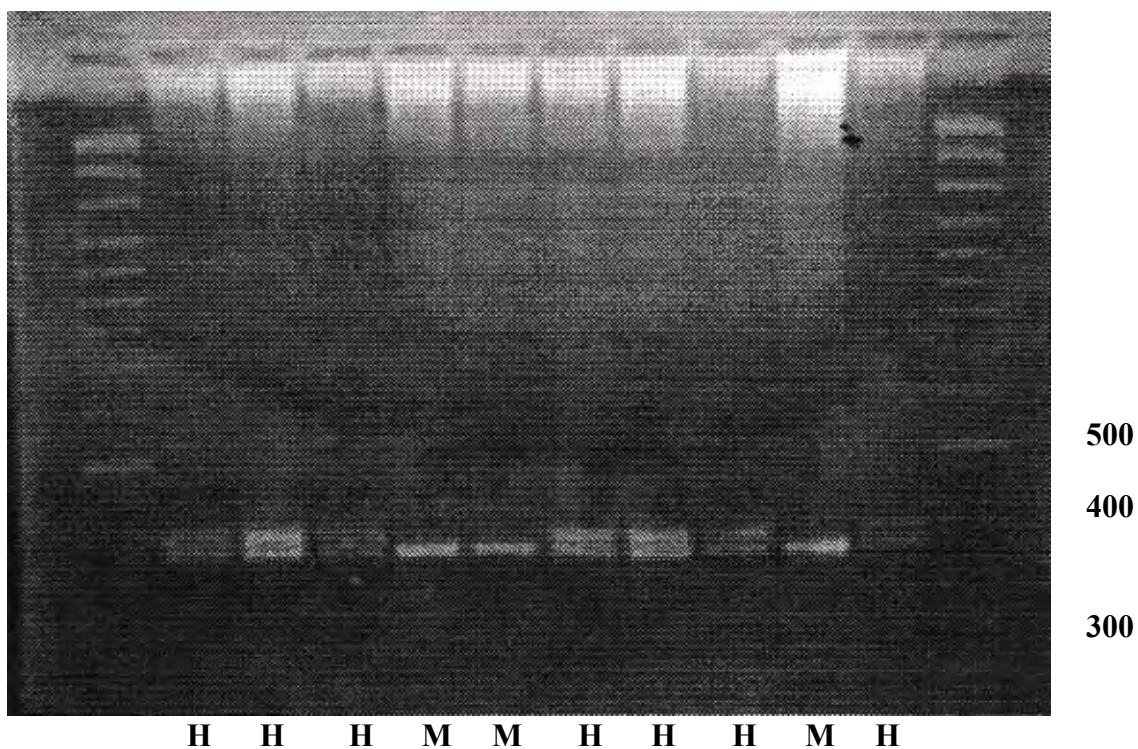


Fig. 19. Visualización de los productos de PCR en guacamayos de sexo conocido.

Los fragmentos están comprendidos entre 400 y 300 bp, correspondiendo 2 bandas para hembra (**H**) y 1 banda para machos (**M**). En la fila superior se encuentra indicada la identificación de las especies de guacamayos, **A** (*Ara ararauna*), **MI** (*Ara militaris*), **C** (*Ara chloroptera*), **M** (*Ara macao*); y **P** (*Propyrrhura couloni*), **MPM** (Marcador de peso molecular de 100 bp).

Tabla 8. Sexo obtenido por ADN en el grupo de especies sin sexo conocido

Ave (a)	Especie	SEXO OBTENIDO POR ADN (b)	
		Macho	Hembra
1	<i>Ara ararauna</i>		X
2	<i>Ara ararauna</i>		X
3	<i>Ara macao</i>	X	
4	<i>Ara macao</i>	X	
5	<i>Ara macao</i>		X
6	<i>Ara macao</i>	X	
7	<i>Ara macao</i>		X
8	<i>Ara macao</i>	X	
9	<i>Ara chloroptera</i>		X
10	<i>Ara chloroptera</i>		X
11	<i>Ara chloroptera</i>		X
12	<i>Ara militaris</i>		X
13	<i>Ara militaris</i>		X
14	<i>Ara militaris</i>		X
15	<i>Ara militaris</i>		X
16	<i>Ara militaris</i>		X
17	<i>Ara militaris</i>		X
18	<i>Propyrrhura couloni</i>		X
19	<i>Propyrrhura couloni</i>	X	
20	<i>Propyrrhura couloni</i>	X	
21	<i>Propyrrhura couloni</i>		X
22	<i>Propyrrhura couloni</i>	X	
23	<i>Propyrrhura couloni</i>	X	
24	<i>Propyrrhura couloni</i>	X	
25	<i>Propyrrhura couloni</i>	X	
26	<i>Propyrrhura couloni</i>	X	
27	<i>Propyrrhura couloni</i>	X	
28	<i>Propyrrhura couloni</i>	X	

(a): Los dígitos y letras fueron determinados en el Laboratorio de genética y virología molecular para un mejor manejo de las muestras.

(b): A los individuos machos les corresponde la amplificación de un fragmento y a los individuos hembras les corresponde la amplificación de 2 fragmentos.

V. DISCUSIÓN.

La toma de muestra de los guacamayos en cautiverio fue realizada durante el control sanitario realizada cada año de manera rutinaria en el Parque de las Leyendas y en el zoológico. A pesar que la muestra permaneció conservada en condiciones de refrigeración por 4 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.

Griffiths *et al.* (1998) determinaron el sexo de 27 especies de aves mediante el uso de 2 cebadores denominados P2 y P8, los cuales amplifican una región no conservada o intrón del gen CHD ubicado en ambos cromosomas sexuales, sin embargo estas regiones difieren en tamaño en ambos cromosomas sexuales siendo posible utilizar esta diferencia como un marcador del sexo en hembras. Estos cebadores fueron aplicados en 5 especies de guacamayos del Perú y lograron determinar el sexo de manera eficaz. Por lo tanto, se demuestra que las especies involucradas en el estudio presentan el gen marcador del sexo, el cual es conservado en todas las especies de aves.

En este estudio se ha observado una concordancia del 100 % entre los resultados de sexaje por pruebas moleculares y por métodos convencionales (sexaje quirúrgico, historia y necropsia) en el grupo de aves de sexo previamente conocido. La determinación del sexo en guacamayos puede realizarse con cualquiera de estos métodos. Sin embargo, el sexaje por análisis de ADN presenta ventajas significativas con respecto a otros métodos de sexaje, debido principalmente a que se puede realizar en aves de todas las edades, genera un mínimo estrés para las aves y resulta ser una prueba rápida y confiable.

En esta investigación se pudo contar con individuos con sexo conocido para la estandarización de la prueba en una primera etapa. Del mismo modo Miyaki *et al.* (1998) utilizó animales con sexo conocido para realizar la evaluación y posterior aplicación de esta

prueba molecular. En ese sentido, el porcentaje de aves sexadas (100%) y el porcentaje de compatibilidad (100%) con los métodos no moleculares coinciden con los resultados obtenidos por Miyaki *et al.* (1998). Posteriormente, en la siguiente etapa se utilizaron guacamayos con sexo desconocido para la aplicación de la prueba ya estandarizada.

El número potencial de parejas reproductivas en una población puede ser mejor estudiado si es que se conoce la proporción de sexos (relación machos: hembras). Esta información es vital en especies en peligro de extinción (la gran mayoría son monógamos) debido a que determinará el tamaño de la siguiente generación (Miyaki *et al.*, 1998). En esta investigación se demuestra que las pruebas moleculares son una importante herramienta que puede ser grandemente usada en la conservación de familias de aves en peligro de extinción. Así mismo, estos métodos son valiosos para los programas de reproducción en cautiverio y los zoológicos pueden aplicarlos para la identificación de sus aves.

Los trabajos de investigación en biología molecular han contribuido directamente en la conservación de especies amenazadas, así tenemos el caso del Guacamayo de Spix (*Cyanopsitta spixii*) del cual Griffiths *et al.* (1998) determinaron el sexo de su último ejemplar en vida libre que resultó ser un macho. A partir de esto, se logró la reintroducción de esta especie. En esta investigación se determinó el sexo de ejemplares de una especie vulnerable y propia de nuestro territorio, el guacamayo de cabeza azul *Propyrrhura couloni*, lo cual representa el primer reporte científico en sexaje molecular para esta especie, lo cual apoya la validez de esta técnica como posible herramienta en programas de conservación debido a que esta es una especie muy comprometida en la problemática del comercio ilegal.

VI. CONCLUSIONES

1. Se logró la estandarización de la prueba molecular mediante amplificación del gen CHD para la determinación del sexo en especies de guacamayos silvestres.
2. Un aporte de esta investigación ha sido el sexaje de 15 ejemplares (10 machos y 5 hembras) de la especie *Propyrrhura couloni*, ave con presencia importante en territorio peruano (Loreto, Ucayali, Madre de Dios y Huánuco) y de la cual anteriormente no se había reportado su sexaje por pruebas moleculares. De esta manera, este trabajo surge como el primer reporte científico realizado en esta especie, que actualmente se encuentra en situación vulnerable.

VII. LITERATURA CITADA

1. Aert, R.; M. Voet; S. Van Campenhout; J. Vander Stappen; G. Volckaert. 1998. Polymerase chain reaction. In Molecular tools for screening biodiversity Plants and animals. Edit. Karp, A Isaac P, Ingram D. Chapman & Hall. London: 111-118.
2. Berger, S.L.; A.R. Kimmel. 1987. Guide Molecular cloning techniques. Academic Press Inc. NY: 812.
3. Bermúdez-Humarán, L.G.; A. García-García; C.H. Leal-Garza; V.M. Riojas; G. Jaramillo-Rangel; R. Montes de Oca Luna. 2002. Molecular sexing of monomorphic endangered Ara birds. Journal Exp Zool. 292: 677-680.
4. Birdlife International. 1997. Handbook of birds of the world. Sandgrouse to cuckoos. Lynx Edition. Barcelona. pp: 425-428.
5. Brightsmith, D.; A. Figari. 2003. Ecología reproductiva y uso de colpas en guacamayos en Madre de Dios. Autorización No 04 S/C-2001-INRENA-DANP.
6. Brown, T. 1994. DNA sequencing. IRL – Oxford University Press. Oxford: 101.
7. Brown, T. 2000. The polymerase chain reaction. In Essential molecular biology. A practical approach. Ed. T.A. Brown. 2o Ed. Vol 2. Oxford University Press. Oxford: 89-120.
8. CITES. 1973. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Washington, D.C.
9. CITES. 2005. Apendices I, II y III. pp: 21-22 Disponible: www.cites.org/eng/app/appendices.pdf
10. Clements, J.F.; N. Shany. 2001. A field guide to the birds of Perú. Ivis Publishing Company. USA. pp: 10-11, 55-56.
11. Collar, N.J.; L.P. Gonzaga; N. Krabbe; N.A. Madroño; L.G. Naranjo; T.A. Parker III; D.C. Wege. 1992. Theratened birds of the Americas. The ICBP/IUCN Red Data Book. Norwichm UK.
12. Charlesworth, B. 1991. The evolution of sex cromosomes. Science. 251: 1030-1033.

13. Charlesworth, B. 1996. The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr Biology*. 6: 149-162.
14. Christidis, L. 1990. *Animal cytogenetics 4: Chordata 3; B, Aves*. Berlin, Gebruder Borntraeger.
15. Delmas, V.; D.G. Stokes; R.P. Perry. 1993. A mammalian DNA-binding protein that contains a Chromodomain and a SNF2/SW12 like helicase domain. *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A.* 20 (6): 2414-2418.
16. El Peruano. 2004. Aprueban categorización de especies amenazadas de fauna silvestre y prohíben su caza, captura, tenencia, transporte o exportación con fines comerciales. D.S. No 034-2004-AG. *El Peruano* 22 de Setiembre – Normas Legales. Pág: 276853- 276855.
17. Ellegren, H. 1996. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag universal sexing of non-ratite birds. *Proc R Soc Lond Biol Sci.* 263 (1377): 1635-41.
18. Ellegren, H.; B.C. Sheldon. 1997. New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds. *Tree*. 12: 255-259.
19. Forshaw, J.M. 1989. *Parrots of the World*. London. Blandford Press.
20. Gómez, J.G.; L.G. Bermúdez; R. Tamez; J.M. Adame; R. Montes de Oca. 2002. Producción y Purificación de la Taq DNA polimerasa a partir de E. coli recombinante. *Ciencia UANL*. 5 (3): 316-321
21. Griffiths, R.; B. Tiwari. 1995. Sex identification of the last wild Spix's macaw. *Nature*: 375, 454.
22. Griffiths, R.; S. Daan; C. Dijkstra. 1996. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 263, 1249-1254.
23. Griffiths, R.; R. Korn. 1997. A CHD1 gene Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene*. 197, 225-229.
24. Griffiths, R.; M.C. Double; K. Orr. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*. 7, 1071-1075.
25. Griffiths, R. 2000. Sex identification of birds. Seminar in avian an exotic pet medicine.
26. Hilty, S.L.; W.L. Brown. 1986. *A guide to the birds of Colombia*. Princeton University Press. United Kingdom. pp: 10.
27. INRENA. 1990. *Principales aves silvestres del Perú*. Lima-Perú. pp: 1-142.
28. Karcher, S. 1995. *Molecular biology. A proyect approach*. Academic Press. USA: 45-134 / 215-227.
29. Kirk, R.W. 1997. *Terapéutica Veterinaria de pequeños animales XII*. Mc Graw-Hill Interamericana. Editores S. A. de C. V. Pág: 1377-1380.

30. Lessells, C.; A. Mateman. 1998. Sexing birds using random amplified polymorphism DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology*. 7, 187-195.
31. Maniatis, T.; J. Fritsch; J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. NY: 100-200.
32. Millar, C.D.; C.E.M. Reed; J.L. Halverson; D.M. Lambert. 1997. Captive management and molecular sexing of endangered avian species. *Biological Conservation*. 82: 81-86.
33. Miyaki, Y.M.; R. Griffiths; K. Orr; L.A. Nahum; S.L. Pereira; A. Wajntal. 1998. Sex Identification of Parrots, toucans and curassows by PCR: Perspectives for Wild and Captive Population Studies. *Zoo Biology*. 17:415-423.
34. Nicholas, F.W. 1987. *Genética Veterinaria*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza-España.
35. Ohno, S. 1967. *Sex chromosomes and sex linked genes*. Berlín, Springer Verlag.
36. Parker, III T.A.; S.A. Paker; M.A. Plengue. 1982. An annotated checklist of peruvian birds. Buteo Books. Vermilio-South Dakota. pp: 11-19, 28, 40.
37. Pautrat, L.; I. Angulo; C. Germaná; C. Uchime; R. Castillo; M. Candela. 2002. Manual de identificación de especies peruanas de flora y fauna silvestres susceptibles al comercio ilegal. Perú. INRENA. Embajada de Finlandia. APECO. WWF. Taller visual. Módulo I: Legislación, administración y procedimientos en el comercio de flora y fauna silvestre.
38. Pautrat, L.; I. Angulo; C. Germaná; C. Uchime; R. Castillo; M. Candela. 2002. Manual de identificación de especies peruanas de flora y fauna silvestres susceptibles al comercio ilegal. Perú. INRENA. Embajada de Finlandia. APECO. WWF. Taller visual. Módulo II: Identificación de especie de fauna silvestre y productos derivados comercializados comúnmente.
39. Pulido, V. 1991. *El Libro Rojo de la Fauna Silvestre en el Perú*. Editorial MAIJOSA.
40. Richner, H. 1989. Avian laparoscopy as a field technique for sexing birds and an assesment of its on wild birds. *J. Field Ornithol*. 60: 137-142.
41. Risser, A.C. 1971. A technique for performing laparotomy on small birds. *Condor* 73: 376-379.
42. Robinson, D.; G. Lafleche. 2000. Nucleic Acid electrophoresis in agarosa gels. In *Essential molecular biology. A practical approach*. Ed. T. Brown. Vol 1. 2o Ed. Oxford University Press. Oxford: 89-120.
43. Sealey, P.; E. Southern. 1982. Gel electrophoresis of DNA. In: *Gel Electrophoresis of nucleic acids a practical*. Ed. Rickwood D, Hames B. IRL Press. Oxford: 39-76.
44. Stefos, K.; F.E. Arrighi. 1971. Heterocromatic nature of W chromosomes in birds. *Experimental Cell Research*. 68: 228-231.

45. Stevens, L. 1997. Sex chromosomes and sex determining mechanisms in birds. *Sci Prog.* 80: 197-216.
46. Stokes, D.G.; R.P. Perry. 1995. DNA-binding and chromatin localization properties of CHD1. *Molecular and Cellular Biology.* 15: 2745-2753.
47. Stracham, T.; A. Read. 1999. *Human molecular genetics 2.* BIOS Scientific Publishers Ltd.
48. UNEP, 2005. UNEP-WCMC Species Database: CITES-Listed Species. Disponible: <http://sea.unep-wcmc.org/isdb/CITES/Taxonomy/tax-species-result.cfm?Genus=Ara&Species=ararauna&source=animals>