

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de ciencias de la salud

Caracterización del sexo en aves psitácidas del género amazona en cautiverio a través de la medición de esteroides sexuales en heces por la técnica de ELISA.

Rafael María Pólit Sosa

Medicina Veterinaria

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Médico veterinario

Quito, 18 de mayo de 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de ciencias de la salud

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Caracterización del sexo en aves psitácidas del género amazona en cautiverio a través de la medición de esteroides sexuales en heces por la técnica de ELISA.

Rafael María Pólit Sosa

Nombre del profesor, Título académico Rommel Lenin Vinueza, DMVZ, M.Sc

Quito, 18 de mayo de 2022

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Rafael María Pólit Sosa

Código: 00207899

Cédula de identidad: 1750157727

Lugar y fecha: Quito, 18 de mayo de 2022

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La falta de dimorfismo sexual de aves como las psitácidas dificulta el establecimiento de programas de reproducción en cautividad para su conservación. Si bien existen muchos métodos para caracterizar el sexo de un ave, estos pueden ser inexactos, tener un alto costo o ser muy invasivos. En el presente estudio se propuso la medición de hormonas esteroideas sexuales en heces de aves psitácidas del género *Amazona* en cautiverio, utilizando la técnica de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Se desarrolló un protocolo con base en pruebas piloto. Eventualmente, se midieron los esteroides sexuales de loros que fueron posteriormente sexados con endoscopia como método de control. Las muestras fecales se procesaron siendo diluidas en metanol (0.5 gramos en 1 ml) y posteriormente homogeneizadas en vórtex por 5 minutos, centrifugadas (2500 rpm por 5 min) y crio preservadas (- 20 °C). Posteriormente, se midieron estradiol (E2) o testosterona (T) usando Kits de ELISA específicos para la detección de estas hormonas. Los resultados fueron analizados y sometidos a pruebas de normalidad en RStudio, y se calcularon los valores predictivos del test. Los resultados de los diferentes ensayos no indicaron una diferencia significativa en las concentraciones de E2 entre individuos machos y hembras ($P = 0.965$). Tampoco se observó una diferencia significativa entre las concentraciones de testosterona fecal en ambos sexos ($P = 0.594$). En los individuos en que se midieron ambas hormonas se midió el coeficiente de estradiol/ testosterona, el coeficiente de las hembras (1.73) fue mayor al de los machos (1.64), sin embargo, no existió diferencia significativa ($P = 0.917$). La sensibilidad y especificidad para la prueba de ELISA estradiol fue de 50% y 60% respectivamente, mientras que la prueba de testosterona tubo una sensibilidad de 20% y

especificidad del 85%. Factores fisiológicos, etológicos y ambientales de las especies de loros del estudio pudieron tener influencia en los resultados obtenidos, así como aspectos relacionados con la prueba de ELISA o el procedimiento de laboratorio. Se concluye que el presente procedimiento empleando la técnica de enzimoanálisis de adsorción no permite caracterizar sexualmente aves psitácidas mediante la medición de estradiol y testosterona fecal.

Palabras clave: ELISA, esteroides, psitácidas, Amazona, estradiol, testosterona, heces, sexo, caracterización.

ABSTRACT

The lack of sexual dimorphism in bird families such as psittacines makes it challenging to establish captive breeding programs for their conservation. Although many methods exist to characterize the sex of a bird, they can be inaccurate, costly, or very invasive. The present study proposed, the measurement of sex steroid hormones in feces of captive psittacine birds of the genus *Amazona* using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. A protocol was developed based on pilot tests. Eventually, sex steroids were measured from parrots and subsequently sexed with endoscopy as a control method. Fecal samples were processed by being diluted in methanol (0.5 grams in 1 ml) and subsequently vortex homogenized for 5 minutes, centrifuged (2500 rpm for 5 min) and cryopreserved (- 20 °C). Subsequently, estradiol (E2) or testosterone (T) were measured using specific ELISA kits for the detection of these hormones. The results were analyzed and subjected to normality tests in RStudio, and predictive test values calculated. The results of the different assays did not indicate a significant difference in E2 concentrations between male and female individuals ($P = 0.965$). There was also no significant difference between fecal testosterone concentrations in both sexes ($P = 0.594$). In individuals in which both hormones were measured, the estradiol/testosterone ratio was measured, and the ratio of females (1.73) was higher than that of males (1.64), but there was no significant difference ($P = 0.917$). The sensitivity and specificity for the estradiol ELISA test were 50% and 60%, respectively, while the testosterone test had a sensitivity of 20% and specificity of 85%. Physiological, ethological, and environmental factors of the parrot species in the study could have influenced the results obtained, as well as aspects related to the ELISA test or the laboratory procedure. It is concluded that the present procedure using the adsorption enzyme

immunoassay technique does not allow sexual characterization of psittacine birds by measuring fecal estradiol and testosterone.

Key words: ELISA, steroids, psittacine, Amazona, estradiol, testosterone, feces, sex, characterization.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	12
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS.....	16
METODOLOGÍA.....	16
RESULTADOS	20
Ensayo Piloto I:.....	20
Ensayo Piloto II:	20
Ensayo estradiol I:	21
Ensayo estradiol II:	22
Ensayo testosterona:	23
Comparación estradiol testosterona:	24
Valores predictivos de la prueba de ELISA:	25
DISCUSIÓN.....	27
Factores fisiológicos:	27
Factores etológicos y ambientales:	29
Prueba de ELISA:	32
Procedimiento:	33
Relación esteroides sexuales:.....	35
Valores predictivos:	37
CONCLUSIONES.....	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla #1. Ensayo piloto I	20
Tabla #2. Ensayo piloto II.....	21
Tabla #3. Valores predictivos ELISA estradiol	26
Tabla #4. Valores predictivos ELISA testosterona	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura #1. Ensayo estradiol I.....	22
Figura #2. Ensayo estradiol II.....	23
Figura #3. Ensayo testosterona	24
Figura #4. Comparación estradiol y testosterona.....	25

INTRODUCCIÓN

En aproximadamente el 30% de todas las especies de aves no se observa un dimorfismo sexual (Bercovitz et al, 1978), lo que representa un gran obstáculo para el éxito de los programas de reproducción en cautiverio de especies silvestres en peligro de extinción. Esto ha desembocado en una amplia variedad de técnicas de sexaje incluidas mediciones anatómicas, laparoscopia, identificación cromosómica o la micro densitometría de núcleos de células sanguíneas (Bercovitz et al, 1978). Algunos estudios que han comparado métodos cito genéticos de identificación cromosómica con la endoscopia quirúrgica han señalado esta última como un método más eficiente, barato, exitoso y que produce identificaciones de mayor calidad. No obstante, el método requiere de más experiencia de uso puesto que tiene un mayor riesgo de causar lesiones o incluso la muerte del ave (Prus et al, 1979).

De entre los muchos procedimientos que se han empleado para la determinación del sexo en aves que carecen de dimorfismo sexual, la medición de hormonas esteroideas sexuales en heces ha sido uno de los más estudiados. Esto se ha debido a que supone un menor estrés en los individuos, siendo un procedimiento no invasivo, la relativa facilidad con la que se realiza y la disminución de costos. A través de diversos estudios en aves se ha establecido como un procedimiento fiable cuando se comparan las concentraciones de estradiol y testosterona para determinar si un individuo es macho o hembra (Czekala et al, 1977). Diferentes protocolos de laboratorio utilizan el radioinmunoensayo “RIA” en conjunto con otros métodos como la hidrólisis enzimática y la cromatografía líquida de alta densidad (Czekala et al, 1977; Stavy et al, 1979; Bercovitz et al, 1982; Tell, 1997; Lee et al, 1999; Dias et al, 2006).

La combinación de estos procedimientos de laboratorio ha permitido medir los esteroides fecales de una gran variedad de órdenes y especies de aves, y por medio de la razón de estradiol/ testosterona (E/T) se ha logrado no únicamente sexar individuos con exactitud, sino establecer rangos predictivos de la actividad gonadal y su variación estacional en aves como el águila calva *Haliaeetus leucocephalus* (Bercovitz et al ,1982). Algunos estudios han logrado un diagnóstico efectivo del sexo de hasta el 74% de los machos y el 92% de las hembras en varias especies. A su vez, estudios en que se midieron las concentraciones esteroides fecales en cacatúas y se calculó la razón E/T, el sexaje tuvo un 95.4% de efectividad en la identificación de hembras y un 96.2% en el sexaje de machos, empleando una sola muestra fecal por individuo (Stavy et al, 1979).

Las técnicas de enzimoimmunoanálisis de adsorción “ELISA” se han desarrollado durante varias décadas, y han sido ampliamente utilizadas como herramientas analíticas para la detección de hormonas, proteínas, péptidos o anticuerpos con alta sensibilidad y fuerte especificidad (Lequin, 2005). Esta técnica está basada en un anticuerpo o antígeno adherido a un soporte sólido para que la unión específica anticuerpo-antígeno reconozca el analito de interés. De este modo la detección se realiza midiendo la actividad de una enzima conjugada con el anticuerpo de detección que forma un complejo con el analito y desencadena una reacción colorimétrica basada en hidrolisis (Thompson, 2010). Algunos tipos de ELISA como el competitivo; implica una unión competitiva del antígeno marcado, siendo bastante sensible y específico. El ELISA tipo sándwich emplea un anticuerpo primario inmovilizado para la captura del analito y un anticuerpo de detección con o sin etiqueta enzimática (lo que determina si es directo o indirecto) que por su lado posee una mayor especificidad. Se distingue también la utilización de sistemas fotométricos o electroquímicos (Tseng, 2015). La medición de testosterona y estradiol en orina por medio de la técnica de ELISA se realizó

tempranamente a través de ensayo inmunoenzimático competitivo (Usha et al, 1983). Para la detección de estradiol en suero sanguíneo se han empleado principalmente ELISA de tipo competitivo tanto electroquímico como fotoeléctrico, y también de tipo sándwich indirecto electroquímico (Tseng, 2015). Por su lado, para la medición de testosterona en sangre, saliva y orina se ha empleado técnicas de ensayo inmunoenzimático tipo sándwich tanto directo como indirecto (Emad, 2006).

La medición de esteroides sexuales fecales representa uno de los métodos de sexaje más sencillos y seguros para las aves en cautividad, y su sensibilidad ha sido probada previamente en varios géneros de aves en los estudios antes mencionados (Czekala et al, 1977; Bercovitz et al, 1978; Stavy et al, 1979; Tell, 1997; Lee et al, 1999), lo que puede permitir el establecimiento de programas reproductivos en cautiverio que sean más efectivos para la conservación de especies de aves silvestres que no presentan dimorfismo sexual, como es el caso de las psitácidas.

Ecuador es uno de los cinco países con mayor diversidad de aves en el mundo, contando en la actualidad con 1699 especies. La familia psittacidae se encuentra entre las 10 más diversas del territorio, con un total de 18 géneros y 47 especies, siendo el género *Amazona* el más representado en conjunto con el género *Ara* (Freile, 2019). Se ha utilizado exitosamente a las psitácidas como modelo de estudio en la medición de hormonas esteroideas sexuales en heces, así como también en el monitoreo de su actividad gonadal, como lo demuestran estudios conducidos en cacatúas (*Nymphicus hollandicus*), periquitos (*Melopsittacus undulatus*) y loros amazónicos de alas naranjas (*Amazona amazónica*), donde la rápida excreción de esteroides sexuales indican que los cambios diarios en la producción de estradiol (E2) y testosterona (T) se reflejan en mediciones de las muestras feco-urinarias diarias (Tell, 1997; Lee et al, 1999). Sin embargo, la mayoría de

procedimientos de laboratorio que han validado la medición de esteroides fecales como método de sexaje o monitoreo gonadal emplean el radioinmunoensayo (Czekala et al, 1977; Stavy et al, 1979; Bercovitz et al, 1982; Tell, 1997; Lee et al, 1999; Dias et al, 2006), sin embargo esta técnica no puede ser utilizada en el Ecuador debido al decreto oficial 978 “Fusiona la Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica (CEEAA) al Ministerio de Electricidad y Energía Renovable (MEER)” emitido en 2008.

Otros métodos de laboratorio para la medición de hormonas esteroideas fecales para el sexaje de animales como el estudio de Cáceres en el cual se sexaron cocodrilos americanos *Crocodylus acutus*, empleando la técnica de ELISA para la medición de testosterona y estradiol en muestras fecales, que fueron diluidas previamente en dietiléter. En este estudio la medición de testosterona fue efectiva para el sexaje de individuos mientras que el estradiol no dio resultados consistentes (Cáceres, 2009). De forma similar y para la monitorización de actividad gonadal en caracoles *Lobatus gigas*, se realizó medición de concentraciones de estradiol y progesterona en muestras fecales diluidas en metanol a través de ELISA (Chong-Sánchez et al, 2019).

Pregunta de investigación

¿Es posible determinar el sexo de un ave psitácida en cautiverio mediante la medición de esteroides sexuales en heces usando el método de ELISA?

HIPÓTESIS

Ha: El sexo de las aves psitácidas puede ser caracterizado midiendo esteroides sexuales en heces a través de la técnica de ELISA.

Ho: El sexo de las aves psitácidas no puede ser caracterizado mediante la medición de esteroides sexuales en heces usando el método de ELISA.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Reportar si a través de la medición de esteroides fecales utilizando la técnica de ELISA es posible caracterizar el sexo de aves psitácidas.

Objetivos específicos:

- Estandarizar un protocolo de laboratorio para la medición de estradiol y testosterona fecal en aves que implique el método de enzimoimmunoanálisis de absorbancia (ELISA).
- Determinar el sexo de individuos de aves psitácidas en cautiverio en base a la diferencia de concentraciones de esteroides sexuales en heces.
- Realizar pruebas análisis estadísticos de los resultados para determinar si existen diferencias significativas, determinar la normalidad o no de la distribución de los datos y medir el valor predictivo de la prueba.

METODOLOGÍA

El presente estudio experimental primero realizo una recopilación bibliográfica de información sobre la literatura científica disponible sobre la medición de esteroides fecales en aves. Después de una revisión exhaustiva, se procedió a la compra de los materiales e insumos de laboratorio necesarios, y se contactó a zoológicos locales para consultar sobre las especies de psitácidas que albergan en sus colecciones y el número de individuos que podrían muestrearse para las pruebas. Así mismo se contactó con un laboratorio clínico veterinario local para el manejo avanzado de las muestras por medio de la prueba de ELISA.

Se procedió a realizar pruebas piloto con el propósito de estandarizar la prueba de medición de estradiol, estas estuvieron basados en los procedimientos de los estudios de Cáceres (2009) y Chong-Sánchez (2019), que emplean dietiléter y metanol respectivamente como diluyente de las muestras para luego medir las concentraciones de estradiol o testosterona utilizando ELISA.

Para las pruebas piloto se empleó arena en lugar de muestras fecales, y se utilizó cipionato de estradiol (Cipiosyn, Zoetis SA, Ecuador) o benzoato de estradiol (Gonadiol, Zoetis SA, Ecuador) para emular al estradiol fecal. La arena utilizada en el ensayo se cernió previamente, se pre mezclaron 4 muestras de arena con las hormonas y se dejaron secar en cajas Petri durante 16 horas. En dos de las muestras se colocó 1 gramo de arena más 1 mililitro de cipionato de estradiol (0.5mg/ml). En otras dos muestras se colocó 1 gramo de arena más 1 mililitro de benzoato de estradiol (1 mg/ml). Se procedió entonces a llenar los tubos con 0.5 gramos de arena premezclada con hormona. En un tubo de arena con cipionato de estradiol y en uno con arena y benzoato de estradiol, se añadió entonces 5 mililitros de metanol; se realizó homogeneización manual por 5 minutos, se dejó en reposo 15 minutos. Finalmente se extrajo el sobrenadante usando pipetas Pasteur y se colectó en tubos falcón de 5 mililitros, acorde al protocolo de Chong-Sánchez 2019. En el otro tubo con arena mezclada con cipionato de estradiol y el otro de arena mezclada con benzoato, se añadieron 0.5 mililitros de dietiléter; se realizó homogeneización manual por 5 minutos; después se adicionaron 1.5 mililitros más de dietiléter y nuevamente se homogenizó durante 5 minutos. El sobrenadante fue colectado con pipetas Pasteur en tubos falcón y después se realizó desecación de las muestras en un horno de vacío (vacuum drying oven) por 40 minutos a temperaturas de 16, 24 y 25 grados centígrados, acorde al protocolo de Cáceres 2009. El sobrenadante de todos los tubos se crió y se preservó a menos de 20 grados Celsius hasta

su procesamiento a través del kit de ELISA estradiol de tipo competitivo retardado (AccuBind ELISA Microwells Estradiol (E2) Test System) o ELISA testosterona de tipo competitivo (AccuBind ELISA Microwells Testosterone Test System) en el laboratorio clínico veterinario seleccionado.

Después de haber probado la validez del método a través de la detección de estradiol mediante la técnica de ELISA en 2 pruebas piloto, se procedió a muestrear aves psitácidas del género *Amazona* en un zoológico local, incluyendo 11 individuos de *Amazona amazónica*, 4 *Amazona autumnalis*, 3 *Amazona mercenarius* y 2 *Amazona farinosa*. Las aves seleccionadas fueron posteriormente sexadas con endoscopia a modo de control, ya que esta técnica es considerada el estándar de oro en el sexaje de aves pese a los riesgos implicados (Prus et al, 1979). Determinando además por este método que todos los individuos seleccionados tenían un desarrollo gonadal completo indicativo de su madurez sexual y la ausencia de patologías. Los materiales utilizados para la realización de la endoscopia fueron un equipo endoscópico inalámbrico (Firefly), fuente de luz, instrumental quirúrgico (cuchilla 10, tijeras, gasa estéril y sutura absorbible multifilamento 4-0).

El sexado endoscópico de las aves fue realizado mediante la técnica de celioscopia a través del abordaje lateral izquierdo con la extremidad extendida hacia craneal, como lo describió Divers en 2015. Los pacientes fueron anestesiados con isoflurano al 6% y mantenidos al 2% utilizando un circuito semicerrado sin re inhalación.

El muestreo de heces se realizó aislando a cada ave en una jaula individual etiquetada, todas las muestras fueron tomadas entre las 8 y 8 y media de la mañana por cuestiones logísticas de manejo y para asegurar la toma de muestras fecales frescas. Las muestras se colectaron siguiendo el protocolo para recolección de muestras coprológicas, únicamente colectando la porción central que no estaba en contacto con el suelo, utilizando una caja y

paleta para muestras fecales individuales para cada animal. Cada caja fue etiquetada con la nomenclatura de la jaula respectiva. Luego de tomadas todas las muestras, estas fueron congeladas.

Se realizó un primer ensayo con muestras fecales de 2 individuos de la especie *Amazona amazónica* (A1 y A2) y un individuo de las especies *Amazona autumnalis* (AU1) y una *Amazona mercenarius* (AF1) que fueron sexadas con endoscopia posteriormente al muestreo. De cada muestra fecal se tomaron 0.5 gramos y se agregó 1 mililitro de metanol; se realizó homogeneización en vortex por 5 minutos; se dejó decantar por 15 minutos. Después se homogenizó nuevamente 1 minuto en vortex. Finalmente, el tubo se colocó en una centrífuga a 2500 revoluciones/minuto por 5 minutos. Se recogió el sobrenadante con pipeta Pasteur y se colectó en un tubo falcón; los tubos se llevaron al laboratorio clínico donde se realizó la prueba de ELISA. Los resultados fueron tabulados para su posterior análisis.

Se realizó un segundo ensayo con heces empleando muestras procedentes de 9 individuos de la especie *Amazona amazónica* (A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11), 3 individuos de las especies *Amazona autumnalis* (AU2, AU3 y AU4), 2 individuos de la especie *Amazona mercenarius* (AF3 y AF5), y 2 individuos de la especie *Amazona farinosa* (AF2 y AF4). Se realizó el procedimiento del primer ensayo en heces; con la diferencia de que se tomaron 3 alícuotas por muestra.

Posteriormente se realizó un ensayo mediante el mismo procedimiento antes descrito para la medición de testosterona fecal empleando el kit de ELISA testosterona, utilizando las muestras de *Amazona autumnalis* (AU2, AU3 y AU4), *Amazona amazónica* (A4, A5, A6, A7, A8, A9 y A11). Todos los resultados se tabularon para su posterior análisis.

Para el análisis de resultados se calculó la media y desviación estándar de las 3 alícuotas por muestra. Posteriormente se realizó una prueba de normalidad utilizando RStudio y se compararon las alícuotas de cada muestra. Cuando la distribución de los valores fue normal se empleó T de Student para determinar si había o no una diferencia significativa entre los valores de las alícuotas o entre los individuos, cuando la distribución no fue normal se empleó la prueba de U Mann-Whitney para comparar las alícuotas o a los individuos entre ellos. Empleando los resultados se midió el valor predictivo del procedimiento.

RESULTADOS

Ensayo Piloto I: En los tubos en los que se empleó dietiléter no se observó separación del sobrenadante, por lo que no se procedió a evaporar las muestras en el horno de vacío y tuvieron que descartarse, en los tubos con metanol se midieron 2 repeticiones.

Tabla #1. Ensayo piloto I

Muestra	Estradiol detectado (pg/ml)	Estradiol colocado (mg/ml)
MC1	1.4	0.5
MC2	1.6	0.5
MB1	2.2	1
MB2	2.1	1

Descripción: los datos obtenidos se distribuyen de manera normal ($P = 0.4083$), existió diferencia significativa al comparar las cuatro muestras ($P = 0.002511$). No se observó diferencia significativa entre el uso de benzoato o cipionato de estradiol ($P = 0.05466$). MC= metanol + cipionato de estradiol; MB = metanol + benzoato de estradiol.

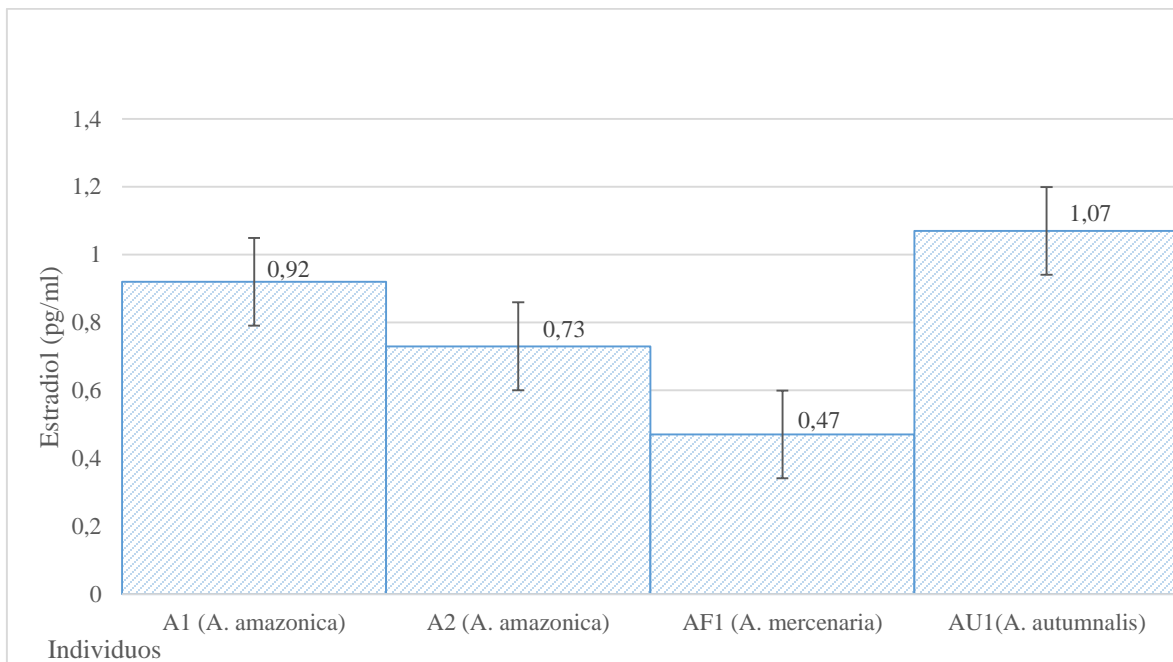
Ensayo Piloto II: los cuatro tubos (2 con metanol y 2 con dietiléter) fueron procesados con la prueba del kit de ELISA estradiol.

Tabla #2. Ensayo piloto II

Muestra	Estradiol detectado (pg/ml)	Estradiol colocado (mg/ml)
CM	0.747	0.5
CD	0.996	0.5
BM	0.464	1
BD	0.864	1

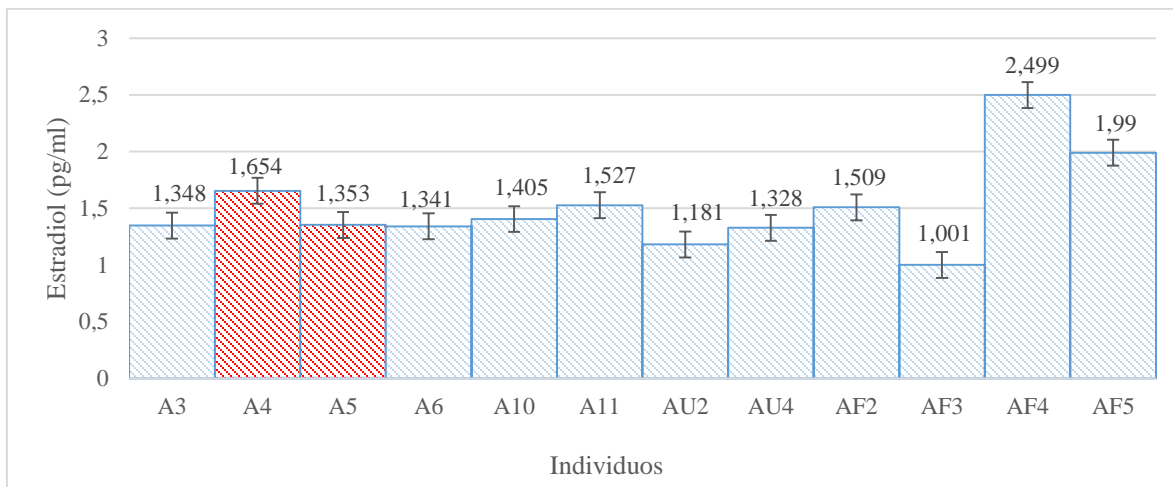
Descripción: los datos se distribuyeron de manera normal ($P = 0.7951$), existió diferencia significativa entre los valores de las cuatro muestras ($P = 0.006569$). No se observó diferencia significativa entre el uso de cipionato y el benzoato de estradiol ($P = 0.4865$), ni se observó diferencia significativa entre el uso de metanol vs dietiléter ($P = 0.2233$). CM= cipionato de estradiol+ metanol; CD= cipionato de estradiol + dietiléter; BM= benzoato de estradiol + metanol; BD= benzoato de estradiol + dietiléter.

Ensayo estradiol I: se realizó el primer ensayo con muestras fecales de 4 individuos tomadas el 20 de diciembre del 2021, las muestras se procesaron usando únicamente metanol como reactivo, se corrió ELISA estradiol para una muestra por individuo.

Figura #1. Ensayo estradiol I

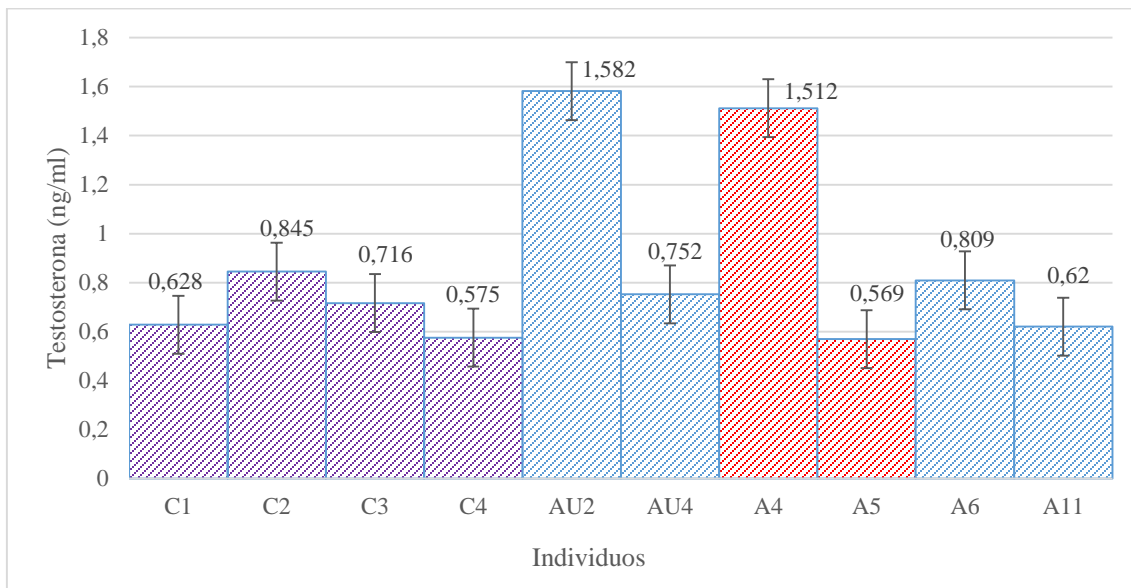
Descripción: concentraciones de estradiol fecal medidas por la técnica de ELISA en cada individuo señalando su especie. A través de endoscopia se determinó que A1 era macho y A2, AF1 y AU1 eran hembras. Los datos se distribuyeron de manera normal ($P = 0.9035$). Existió diferencia significativa entre los individuos ($P = 0.008606$).

Ensayo estradiol II: se emplean muestras fecales tomadas el 5 y 6 de enero. Las muestras de A7, A8, A9 (hembras *Amazona amazónica*) y AU3 (macho *Amazona autumnalis*) perdieron su etiquetado, por lo que no fueron procesadas en este ensayo. Para cada individuo se procesaron 3 alícuotas que fueron corridas en el ELISA-estradiol, con excepción de AF2 y AF4 en que solo alcanzo materia fecal para 2 alícuotas y AF3 en que solo alcanzo para una.

Figura #2. Ensayo estradiol II

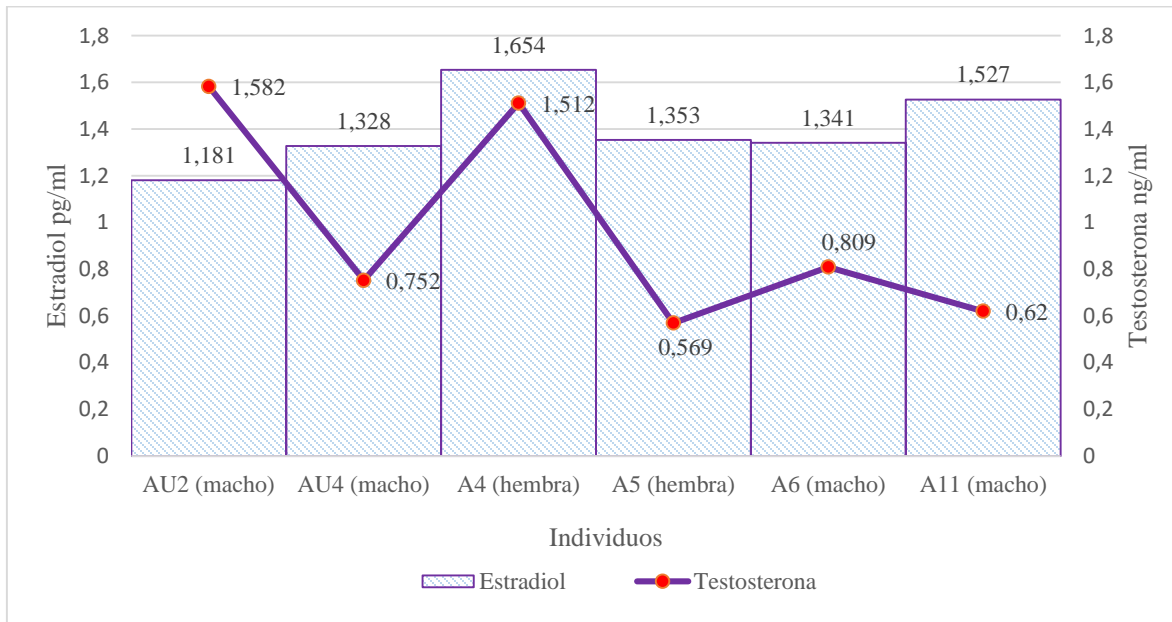
Descripción: concentraciones medias de estradiol por cada individuo; los valores de las medias no se distribuyeron de manera normal entre los individuos ($P = 0.04024$), y se presentó una diferencia significativa entre los mismos ($P = 0.0004883$). No se observó diferencia significativa ($P = 0.9659$) al comparar las concentraciones de estradiol fecal entre machos (azul) y hembras (rojo). A = Amazona amazónica, AU= Amazona autumnalis; AF2 y AF4 = Amazona farinosa; AF3 y AF5 = Amazona mercenaria.

Ensayo testosterona: se emplearon muestras fecales tomadas el 5 y 6 de enero y posteriormente crio preservadas. Las muestras que habían perdido su etiquetado se identificaron como C1, C2, C3 y C4, por las endoscopias se sabe que eran 3 hembras y un macho. Para cada individuo se procesaron 3 alícuotas que fueron procesadas con la ELISA-testosterona.

Figura #3. Ensayo testosterona

Descripción: concentraciones medias de testosterona fecal en los individuos; los valores de las medias no se distribuyeron de manera normal entre los individuos ($P = 0.002296$). Se encontró diferencia significativa entre los individuos ($P = 0.001953$), pero no se encontró diferencia significativa ($P = 0.5946$) en las concentraciones de testosterona fecal entre machos (azul) y hembras (rojo), entre los individuos sin identificación (púrpura) había tres hembras y un macho de acuerdo a la endoscopia, hubo diferencia significativa entre las 4 muestras ($P = 0.001337$).

Comparación estradiol testosterona: se compararon las concentraciones de estradiol y testosterona de aquellos individuos en que se habían medido ambas hormonas a través de la técnica de ELISA.

Figura #4. Comparación estradiol y testosterona

Descripción: comparación en las medias de las concentraciones de estradiol y testosterona fecal en los individuos en que se midieron ambas hormonas, se señala el sexo de cada individuo comprobado con endoscopia. Los datos se distribuyeron de manera normal entre los individuos para el estradiol ($P= 0.6181$) y la testosterona ($P= 0.06149$). Al medirse la razón estradiol testosterona (E/T) de cada individuo y calcularse una media de los coeficientes para las hembras (1.73) y los machos (1.64), no se halló una diferencia significativa ($P= 0.9176$) entre los coeficientes de ambos sexos. A = Amazona amazónica, AU= Amazona autumnalis.

Valores predictivos de la prueba de ELISA: Con base en los resultados se calculó la sensibilidad (SE), especificidad (ES) y los valores predictivos positivos (VP+) y negativos (VP-) de cada prueba. Tomando en cuenta los resultados del segundo ensayo de estradiol (Figura 2) se tomó un punto de corte de 1.44 pg/ml. Representando en este caso SE a la proporción de individuos hembras con concentraciones de estradiol superiores al punto de corte, ES siendo la proporción de individuos machos con concentraciones de estradiol por debajo del punto de corte, el VP+ como la probabilidad de que un individuo con estradiol sobre el punto de corte sea hembra y VP- como la probabilidad de que un individuo con estradiol por debajo del punto de corte sea macho.

Tabla #3. Valores predictivos ELISA estradiol

	(+) Hembra	(-) Macho	Total
[E2] > a 1.44 pg/ml	1	4	5
[E2] < a 1.44 pg/ml	1	6	7
Total	2	10	12

Descripción: Evaluación de la prueba de ELISA-estradiol para caracterizar una psitácida como hembra. [E2] = concentración de estradiol, (+) = hembras sexadas con endoscopia; (-) machos sexados con endoscopia. SE =50%, ES=60%, VP+=20%, VP-=85%, para una muestra de n=12.

Tomando en cuenta los resultados del ensayo de testosterona (Figura 3) se tomó un punto de corte de 0.86 ng/ml. Representando en este caso SE a la proporción de individuos machos con concentraciones de testosterona superiores al punto de corte, ES siendo la proporción de individuos hembras con concentraciones de testosterona por debajo del punto de corte, el VP+ como la probabilidad de que un individuo con testosterona sobre el punto de corte sea macho y VP- como la probabilidad de que un individuo con testosterona por debajo del punto de corte sea hembra.

Tabla #4. Valores predictivos ELISA testosterona

	(+) Macho	(-) Hembra	Total
[T] > a 0.86 ng/ml	1	1	2
[T] < a 0.86 ng/ml	4	4	8
Total	5	5	10

Descripción: Evaluación de la prueba de ELISA-testosterona para caracterizar una psitácida como macho. [T] = concentración de testosterona, (+) = machos sexados con endoscopia; (-) hembras sexadas con endoscopia. SE =20 %, ES=85%, VP+ =50%, VP-=50%, para una muestra de n= 10.

DISCUSIÓN

Conforme a los objetivos de este estudio, fue posible estandarizar un protocolo de laboratorio para la medición de estradiol y testosterona fecal en aves que implique el método de enzimoimmunoanálisis de absorbancia (ELISA). La medición de esteroides fecales por medio de esta técnica no permitió caracterizar el sexo de aves psitácidas de manera concluyente con los resultados obtenidos. Sin embargo, los datos obtenidos permitieron un análisis estadístico y la determinación de los valores predictivos de la prueba.

Factores fisiológicos:

Algunos factores biológicos y fisiológicos propios de estas especies de loros pueden haber influido en los niveles de estradiol y testosterona fecal que se ilustran en las figuras 1, 2 y 3. Entre estos pueden mencionarse la época de reproducción y maduración sexual de los individuos de cada especie.

Varios estudios demuestran que los niveles de los principales esteroides gonadales aumentan durante el apareamiento, desarrollo sexual y durante la temporada de reproducción, por lo que la madurez sexual de las aves influye en la producción de hormonas sexuales (Dias E & De Oliveira C, 2006). Si bien no existen registros que corroboren la edad de las aves muestreadas en este estudio, mediante la endoscopia se comprobó que todos los individuos tenían un desarrollo gonadal completo, indicativo de su madurez sexual, además los pesos de todos los loros fueron concordantes con los de individuos adultos de sus respectivas especies (Austin, R, 2014; Ritter, 2001; Sholty, 2006).

En un estudio en que se midieron hormonas esteroideas sexuales en heces de varias especies de psitácidas, entre las que se incluyó a *Amazona amazónica* y a otras seis especies del mismo género, se observó que la temporada de cría de las aves del criadero se daba principalmente en noviembre y en menor medida en marzo, según los registros de eclosión

(Dias E & De Oliveira C, 2006), aunque el estudio no menciona de manera específica a que especies corresponden estos periodos de reproducción. Otra investigación sobre los perfiles de esteroides urofecales en Amazona aestiva señaló que el periodo reproductivo de estos loros monógamos abarca de julio a noviembre (Pereira et al., 2018). Para el presente estudio, todas las muestras fecales se tomaron entre diciembre y enero, por lo que estarían fuera de los periodos antes mencionados, lo que probablemente pudo haber afectado las concentraciones de esteroides sexuales de las aves. Entre los estímulos asociados a la reproducción estacional, de origen intrínsecamente genético; pueden mencionarse al fotoperíodo, que es particularmente influyente en las cacatúas (Millan, 2000). No obstante, no se ha determinado su relación directa con la estacionalidad reproductiva de Amazona amazónica, cuya época reproductiva varía a lo largo de su rango de distribución (Austin, R, 2014).

Teniendo en cuenta que los niveles séricos de hormonas esteroideas sexuales se asocian con determinadas etapas reproductivas en los loros, los niveles de testosterona pueden ser importantes en el establecimiento de territorios y en la defensa del nido. Paralelamente, los niveles elevados de testosterona también pueden ser incompatibles con el papel fundamental que cumple la amazona macho al alimentar a su pareja durante la puesta de huevos, la incubación y cría (Deviche et al., 2011). Este descenso fisiológico de testosterona podría explicar los niveles bajos de testosterona fecal hallados en algunos individuos machos como A6 y A11 (Figura 3), sin embargo, los loros del estudio nunca se reprodujeron ni ovopositaron, aunque es relevante agregar que no hubo seguimiento de comportamiento como para determinar si las aves formaron parejas en algún momento. La investigación de Millan en el 2000, señaló que en las cacatúas *Nymphicus hollandicus*, la hormona luteinizante (LH) se eleva en machos y hembras después de la foto estimulación y

la inspección del nido. Sin embargo, los niveles de LH no son significativamente elevados en las aves que no tienen pleno acceso a sus parejas, lo que ilustra la importancia de la interacción con la pareja para estimular la secreción de LH y la consiguiente secreción de estradiol.

Factores etológicos y ambientales:

Los niveles de hormonas sexuales de cada individuo también están influenciados por factores etológicos como las interacciones con otros individuos, la dominancia, la proporción de machos y hembras en un entorno determinado y los comportamientos sociales específicos de cada especie e individuo (Meehan et al., 2003).

Como lo mencionan (Dias E & De Oliveira C, 2006), las concentraciones de esteroides sexuales en las heces de dos machos de *Amazona aestiva* que eran dominados por sus congéneres eran compatibles con los de hembras, mencionando que en su estado natural los machos ocupan posiciones jerárquicas más altas que las hembras. Esto denota que la adaptación local a entornos en cautiverio también puede afectar al comportamiento y, en consecuencia, las relaciones entre individuos y su fisiología reproductiva. Los factores sociales podrían explicar las concentraciones de estradiol elevadas en comparación a los otros individuos que se observan en machos como A1 (Figura 1) y AF4 y AF5 (Figura 2). El factor social cobra especial importancia si se toma en cuenta que las aves del estudio estaban agrupadas en recintos por especie, es decir 11 individuos de *Amazona amazónica* (6 hembras y 5 machos), 4 *Amazona autumnalis* (3 machos y una hembra), 3 *Amazona mercenarius* (2 machos y una hembra) y 2 *Amazona farinosa* (2 machos), considerando que había números desiguales de machos y hembras en todos los grupos y uno de ellos solo tenía machos, no puede descartarse a la interacción entre congéneres como un posible factor que generara

estradiol elevado y testosterona baja en algunos machos y testosterona elevada y estradiol bajo en algunas hembras como A4 (Figura 3).

En una investigación sobre el desarrollo temprano del comportamiento, el comportamiento reproductivo, y los cambios endocrinos durante el ciclo reproductivo de cacatúas (*Nymphicus hollandicus*) y loros amazónicos de alas naranjas (Amazona amazónica). Se determinó que, en ausencia de estrés, pueden utilizarse diversas manipulaciones ambientales y sociales pro sexuales para estimular la reproducción de estas aves (Millan, 2000). En los loros amazónicos estimulados para criar mediante la provisión de cajas nido (con y sin foto estimulación), tanto la testosterona y el estradiol mostraron cambios drásticos en función del sexo a lo largo del ciclo reproductivo (Millan, 2000). Los niveles de testosterona fueron variables en distintas etapas del ciclo reproductivo, elevándose en la inspección inicial de la caja nido, pero luego disminuyendo durante la puesta de huevos, incubación y cría, los niveles de testosterona en hembras eran consistentemente mucho más bajos en los mismos tiempos de muestreo. Por el contrario, los niveles de estradiol en las hembras fueron muy elevados solo durante el periodo de puesta de huevos (Millan, 2000).

Los individuos del estudio no tuvieron acceso a factores pro sexuales como las cajas nido. Esto podría explicar la ausencia de concentraciones elevadas de estradiol de las hembras en el segundo ensayo de estradiol, así la ausencia de concentraciones elevadas de testosterona en los machos (Figura 3), con la excepción del individuo AU2. Sin embargo, Pereira et al (2018) midieron los perfiles anuales de esteroides urofecales combinados de las parejas de amazonas de frente azul y observaron que los machos que no conseguían reproducirse conservaron una producción hormonal gonadal más cercana a la de los machos exitosos, mientras que la función ovárica en las hembras no ponedoras difirió claramente de

la de las hembras ponedoras. De lo que se infiere que estos estímulos pudieron repercutir más en las concentraciones de estradiol que en las de testosterona.

Se ha demostrado que el estrés disminuye inmediatamente los niveles de la mayoría de las hormonas sexuales plasmáticas, lo que probablemente reduzca aún más los niveles de esteroides fecales. Sin embargo, la presencia de congéneres de sexo opuesto entre las aves alojadas individualmente puede elevar los niveles de testosterona en plasma, contrarrestando quizás el efecto del estrés (Klaphake et al., 2009). Si bien los individuos no tenían un programa formal de enriquecimiento que modulara su estrés, si tenían enriquecimientos esporádicos y un programa de medicina preventiva dos veces al año. No obstante, en una investigación realizada en *Amazona ventralis* no se encontraron correlaciones directas entre los niveles de androstenediona, 17 β -estradiol y LH en plasma y los niveles de 17 β -estradiol y testosterona en heces (Klaphake et al., 2009).

Varios de los factores que desencadenan la conducta sexual de los loros dependen del desarrollo temprano del comportamiento. En las cacatúas, una pareja unida contribuye en gran medida al rendimiento reproductivo porque probablemente aprenden a reconocer a los congéneres como potenciales compañeros a través de un aprendizaje temprano (Shields et al., 1989). Se ha observado que la cría a mano puede producir desventajas reproductivas, particularmente si se lleva a cabo desde la etapa neonatal, puesto que la manipulación humana altera la conducta y sistema inmune en aves jóvenes y adultas (Millan, 2000). Todas las aves del presente estudio fueron rescatadas del tráfico ilegal, y es muy probable que estuvieran expuestas a la manipulación humana en una etapa temprana o prolongada de sus vidas. Por lo que, pese a que en varios casos coexistían con congéneres del sexo opuesto, puede que no desarrollaran procesos de socialización normales. Reforzando este punto, un estudio realizado en parejas reproductoras de *Amazona aestiva* señaló que incluso en machos con

gónadas activas y funcionales, la falta de éxito reproductivo podía deberse a traumas del individuo, aviarios superpoblados, impronta, emparejamiento reciente, inexperiencia e incompatibilidad de la pareja (Pereira et al., 2018).

Prueba de ELISA:

En el estudio de Cáceres (2009), en que esta investigación basó su procedimiento parcialmente, las concentraciones de esteroides sexuales fecales de cocodrilos que pudieron ser medidas con la técnica de ELISA competitivo, se obtuvieron en ng/ml para el estradiol y las en mg/ml para testosterona. Las concentraciones mucho más altas de ese estudio bien pueden deberse a que la especie investigada es muy diferente, o al uso de dietiléter en lugar de metanol. Sin embargo, este último punto quedaría refutado, ya que en el segundo ensayo piloto se observó que no existía una diferencia significativa en el estradiol obtenido cuando se empleaba dietiléter o metanol ($P = 0.2233$). Además, debe tenerse en cuenta que las concentraciones de estradiol en el estudio con cocodrilos no fueron concluyentes para la determinación del sexo de los individuos, puesto que se intercalaban entre machos y hembras.

Por su parte, la investigación en que se midieron los esteroides sexuales fecales de caracoles para el monitoreo de su actividad Gonadal (Chong-Sánchez et al., 2019) las concentraciones de estradiol obtenidas oscilaron entre 0.3 a 3.6 ng / ml con enzimoanálisis (EIA) y 0.4 a 2.1 ng / ml con cromatografía líquida de alta eficacia, usando metanol para la dilución de las muestras en ambos casos. Las concentraciones de estradiol fecal en losos medidas con ELISA competitivo en esta investigación oscilaron entre 0.47 a 2.49 pg/ml (Figura 1 y 2), una concentración muy inferior a la de los otros dos métodos de laboratorio, aunque debe tenerse en cuenta la diferencia de las especies estudiadas.

En un estudio que midió hormonas sexuales fecales de *Amazona ventralis* utilizando inmunoensayo enzimático heterólogo, las concentraciones de estradiol fecal se midieron

entre 3,9-500 ng/ml. Las concentraciones de testosterona fecal medidas estuvieron entre 1,9-500 pg/ml mediante un inmunoensayo enzimático con un antisuero policlonal (Klaphake et al., 2009). En el presente estudio, las concentraciones medias de estradiol fecal detectado por la técnica de ELISA alcanzaron un máximo 2,5 pg/ml, que es menor al rango inferior de las concentraciones detectadas con EIA. Mientras que las concentraciones medias de testosterona fecal variaron entre 0.56 y 1,58 ng/ml, siendo por el contrario muy superiores a los valores obtenidos con EIA.

Como señalan algunos estudios, los conjugados de E2 que excretan las hembras de periquitos y loros amazónicos de alas naranjas son mono sulfatos basados tanto en el estradiol como en la estrona, mientras que los conjugados androgénicos que excretan las hembras de ambas especies son metabolitos en forma conjugada y no libre (Julian Lee Lisa Tell & Bill Lasley, 1999). Por lo que la forma metabólica en la que se excretaron los esteroides sexuales y la posible reactividad cruzada o falta de sensibilidad de la ELISA con otros metabolitos es un factor a tomar en consideración.

Por ello, es importante mencionar, que los kits de ELISA utilizados presentaban una baja reactividad cruzada (menos del 0.001 en todos los casos) a sustancias como androstenediona, dihidrotestosterona, cortisona, corticosterona, cortisol, entre muchas otras. Lo que destaca una reactividad cruzada mucho menor que el enzimoimmunoanálisis ocupado para el perfil hormonal fecal de Amazona aestiva, que presentaba reacciones cruzadas del 57,3% con la dihidrotestosterona; del 0,2% con la androstenediona; del 0,4% con la androsterona; y de <0,04% con otros metabolitos probados (Pereira et al., 2018). Si bien la falta de reactividad cruzada pudo evitar resultados inexactos, también pudo omitir metabolitos o formas metabólicas relevantes de las hormonas estudiadas.

Procedimiento:

Como método estándar de oro de sexaje de los loros, otros han empleado la determinación del sexo por PCR, para así corroborar los resultados de la medición de hormonas sexuales urofecaes (Dias E & De Oliveira C, 2006) en lugar de la endoscopia utilizada en el presente estudio. Así mismo se describe un seguimiento individual de cada individuo para la colección de muestras fecales y su crío preservación a -20°C (Dias E & De Oliveira C, 2006; Pereira et al., 2018). Sin embargo, en el estudio de Dias y De Oliveira, se liofilizó las muestras para incrementar su tiempo de preservación y se utilizó solución salina tamponada en fosfato (PBS) y no metanol para su solubilización.

Después del segundo ensayo piloto se decidió solo emplear el metanol como reactivo, por su procedimiento más sencillo y su mayor disponibilidad, el dietiléter se descartó como reactivo por su procedimiento más largo y complejo, y por el hecho de ser una sustancia controlada difícil de adquirir.

Mientras que en el estudio de Pereira las muestras uro fecales se secaron (57°C por 72 horas), se pulverizaron, y homogeneizaron antes de la extracción de esteroides en suspensiones de metanol al 80% en proporción de 0.1 g de muestra en 2 ml. En la presente investigación se empleó el metanol para la dilución de las muestras, en una proporción de 0.5 mg en 1 ml. Sin embargo, las muestras no se secaron previamente, por lo que pese a la crío preservación, la integridad y duración de las muestras pudo verse afectada por la humedad. No obstante, según Julian Lee Lisa Tell & Bill Lasley, (1999) tanto en los periquitos como en los loros amazónicos de alas anaranjadas, la mayoría de los metabolitos de E2 y T se encuentran dentro del componente acuoso de las muestras fecales/urinarias solubilizadas por lo que al secar las muestras podría perderse parte de las hormonas excretadas.

No puede descartarse que la heterogeneidad en los resultados obtenidos para las concentraciones fecales de ambas hormonas pudo no haber sido preciso. Teniendo en cuenta que los kits de ELISA empleados para la medición tanto del estradiol como de la testosterona estaban diseñados para procesar muestras de sangre en humanos y no habían sido previamente validados para muestras fecales ni para una especie distinta. Tampoco se descarta la presencia de contaminación (debida al origen fecal de las muestras) que influyera en la lectura del equipo. Teniendo en cuenta que durante la realización del trabajo existieron problemas con la nomenclatura de algunas muestras (Figura 3) no puede tampoco descartarse la posibilidad de una confusión parcial entre las muestras de algunos individuos.

Relación esteroides sexuales:

La razón entre estradiol y testosterona (E/T) se realiza por medio de la medición de los metabolitos de los esteroides sexuales en las aves, determinando la relación entre hormonas masculinas y femeninas. Asumiendo que los testículos activos secretan una preponderancia de andrógenos que a su vez se filtran a través del riñón, disminuyendo las relaciones E/T excretoras, y que los ovarios activos secretan más estrógenos, elevando análogamente los valores E/T. Si el resultado de esta relación tiene valores altos, debido a una alta concentración de estrógenos y una baja concentración de andrógenos, el ave será sexado como hembra. Si el resultado es bajo (lo contrario de la primera), se sexará como macho (Bercovitz, A. B et al., 1982; Dias E & De Oliveira C, 2006; Stavy, M et al., 1979). En el presente estudio los coeficientes calculados no coinciden con lo dicho en la literatura, puesto que no existe una diferencia significativa entre los coeficientes de ambos sexos ($P=0.9176$), siendo coherente con el hallazgo de que las concentraciones fecales de esteroides sexuales entre machos y hembras se intercalaban, son necesarios más estudios para aclarar este fenómeno.

En el estudio conducido para determinar el sexo de aves monomórficas utilizando RIA y el coeficiente E/T, el promedio de la relación entre los machos de psitácidos fue de 0,64 (n = 20 de 6 especies) en comparación con hembras con un 2,78 (n = 29 de 13 especies) con un $P < 0,001$ (Bercovitz, A. B et al., 1978). Empleando la técnica de ELISA en el presente estudio, el promedio de E/T en los machos fue de 1,64 (n=4 de 2 especies) y 1,72 para las hembras (n=2 de una especie), estando los resultados fuera de los promedios establecidos por Bercovitz. Esto puede deberse entre otras causas al tamaño más pequeño de la muestra y al menor número de especies de psitácidas en el estudio. Sin embargo, los resultados obtenidos son cercanos a los coeficientes calculados para individuos no sexados (1,6), y las hembras tuvieron un coeficiente cercano al que se estableció para *Amazona amazónica* del mismo sexo (1,97) (Bercovitz, A. B et al., 1978).

Por otro lado, una investigación que empleó RIA e hidrólisis enzimática para el sexaje de varias familias de aves, incluyendo psitácidas, determinó que el valor modal de E/T en machos era de 1,4 y en hembras de 6.5, y señaló que en algunas especies, los machos tendrán normalmente una relación E/T de menos de 1.5, mientras que en otras suelen tener relaciones E/T de 3 o incluso más (Stavy, M et al., 1979).

En el estudio de Dias, los niveles medios de estrógeno de las hembras no tuvieron una diferencia significativa al compararlos con los niveles medios de estrógeno de los machos ($P=0,9364$), lo que es congruente con los resultados en (figura 2) $P = 0.9659$. Según el autor, este hecho puede explicarse por la baja actividad gonadal de las hembras en comparación con los machos, lo que hace que sus niveles estrogénicos disminuyan o incluso se mantengan por debajo de los de los machos (Dias E & De Oliveira C, 2006). No obstante, en los resultados de la medición de la testosterona fecal sí mostraron una diferencia significativa

entre machos y hembras ($P = 0,0002$), lo que difiere con los resultados del ensayo de testosterona de este estudio (Figura 3).

Valores predictivos:

En lo que respecta al valor predictivo para determinar el sexo de psitácidas por medio de la medición de esteroides sexuales, el estudio de Dias y Oliveira que empleó RIA y la razón E/T, alcanzando una precisión del 70% al medir andrógenos, sin embargo, los valores medidos del estrógeno se superponían entre machos y hembras (Dias E & De Oliveira C, 2006). En la literatura, el porcentaje de precisión en la determinación del sexo de los psitaciformes basado en la Ratio factor fue del 63,5%, al utilizar radioinmunoensayo y la razón E/T (Bercovitz, A. B et al., 1978).

Otros estudios señalan una identificación del sexo fiable de incluso un 90% en donde se menciona además que, si se hubiera tomado una relación E/T de 3,0 como la línea divisoria normal entre machos y hembras, se habría logrado un diagnóstico correcto del sexo 74% de los machos y el 92% de las hembras (Stavy, M et al., 1979).

Por su parte, el inmunoensayo enzimático (EIA) empleado para determinar el estado de actividad gonadal de Amazona aestiva midiendo andrógenos y progestágenos fecales, tuvo una precisión y sensibilidad del 94,55% y 58,13% respectivamente (Pereira et al., 2018).

En el presente estudio la sensibilidad y especificidad del uso de la prueba de ELISA para determinar el sexo de un individuo midiendo la concentración de estradiol fecal fue de 50% y 60% respectivamente. De esto puede concluirse que debido a la baja sensibilidad hay un 50% de probabilidad de caracterizar correctamente el sexo de un ave si sus concentraciones de estradiol están sobre el punto de corte seleccionado (1.44 pg/ml), pero hay un 60% de probabilidad de que un individuo con concentraciones por debajo de este punto sea sexado correctamente como macho. En el caso de la utilización de la medición de

testosterona fecal a través de la prueba de ELISA, la sensibilidad fue incluso más baja (20%) por lo que no puede considerarse un método fiable para sexar un individuo como macho, no obstante la especificidad fue mayor (86%), lo que indica que un individuo con concentraciones de testosterona por debajo del punto de corte (0.86 ng/ml) es muy probablemente una hembra, aunque tanto los valores predictivos positivos y negativos fueron del 50%, por lo que la prueba no resulta fiable.

CONCLUSIONES

Con base en esta investigación, puede concluirse que el presente procedimiento empleando la técnica de ELISA no permite caracterizar sexualmente aves psitácidas mediante la medición de estradiol y testosterona fecal. Se recomienda un seguimiento previo más exhaustivo de los individuos a muestrear y sus características específicas, haciendo énfasis en las condiciones sociales en las que cohabita con sus congéneres y estímulos del entorno. Se exhorta así mismo a utilizar una mayor muestra de individuos. Se recomienda también la utilización de un kit de ELISA especie específico, validado para una especie cercana, o que esté específicamente diseñado para la medición de esteroides fecales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Austin, R. (2014). Amazona amazonica (Orange-winged Parrot). *The Online Guide to the Animals of Trinidad and Tobago*. Recuperado el 8 de abril del 2022 de: <https://sta.uwi.edu/fst/lifesciences/sites/default/files/lifesciences/images/Amazona%20amazonica%20-%20Orange-winged%20Parrot.pdf>
- Bercovitz, A. B., Collins, J., Price, P., & Tuttle, D. (1982). Noninvasive assessment of seasonal hormone profile in captive bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). *Zoo Biology*, 1(2), 111–117. doi:10.1002/zoo.1430010204
- Bercovitz, A. B., Czekala, N. M., & Lasley, B. L. (1978). A New Method of Sex Determination in Monomorphic Birds. *The Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 9(4), 114. Doi: 10.2307/20094391
- Cáceres, R. (2009). Identificación de sexo por hormonas esteroides en orina y heces fecales de *Crocodylus acutus*. *Centro de Investigación en Materiales Avanzados Repositorio*. Tesis doctoral Herpetología. Recuperado el 12 de octubre del 2021 de: <https://207.249.123.218/jspui/handle/1004/2288>
- Chong-Sanchez, F., Enriquez-Diaz, M., Aldana-Aranda, D. (2019). Cuantificación de hormonas 17 β - estradiol y progesterona en el caracol rosa *Lobatus gigas* (Mollusca, Gastropoda). *Revista de biología tropical*. 67(4), 708-715. <https://dx.doi.org/10.15517/rbt.v67i4.34793>
- Czekala, N. M., & Lasley, B. L. (1977). A technical note on sex determination in monomorphic birds using faecal steroid analysis. *International Zoo Yearbook*, 17(1), 209–211. doi:10.1111/j.1748-1090.1977.tb00912.x
- Deviche, P., Hurley, L. L., & Fokidis, H. B. (2011). Chapter 2 Avian Testicular Structure, Function, and Regulation. *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749291100022>
- Dias, E. A., & de Oliveira, C. A. (2006). Psittacine sex determination by radioimmunoassay (RIA) of sex steroids using fecal samples. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. Recuperado el 9 de diciembre de 2020 de: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR2013901017>
- Divers, S. J. (2015). Endoscopic Sex Identification in Chelonians and Birds (Psittacines, Passerines, and Raptors). *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*. 18(3): 541–554. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2015.05.006>

- Emad A.S. Al-Dujaili (2006). Development and validation of a simple and direct ELISA method for the determination of conjugated (glucuronide) and non-conjugated testosterone excretion in urine. *Clinica Chimica Acta*, 364(1-2), 0–179.
doi:10.1016/j.cccn.2005.06.019
- Freile, J. F., Poveda, C. (2019). Amazona amazonica En: Freile, J. F., Poveda, C. 2019. Aves del Ecuador. Versión 2019.0. *Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador*.
<https://bioweb.bio/faunaweb/avesweb/FichaEspecie/Amazona%20amazonica>, acceso lunes, 7 de febrero de 2022.
- Klaphake, E., Fecteau, K., deWit, M., Greenacre, C., Grizzle, J., Jones, M., Zagaya, N., Abney, L. K., & Oliver, J. (2009). Effects of Leuprolide Acetate on Selected Blood and Fecal Sex Hormones in Hispaniolan Amazon Parrots (*Amazona ventralis*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 23(4), 253-262.
<https://doi.org/10.1647/2008-061R.1>
- Lee, J; Tell, L; Lasley, B. (1999). A comparison of sex steroid hormone excretion and metabolism by psittacine species. *Zoo Biology*, 18(4), 247–260. Doi: 10.1002/(sici)1098-2361(1999)18:4<247::aid-zoo1>3.0.co;2-d
- Lequin, RM. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 2005;51:2415-8. Doi:10.1373/clinchem.2005.051532
- Meehan, C. L., Garner, J. P., & Mench, J. A. (2003). Isosexual pair housing improves the welfare of young Amazon parrots. *Applied Animal Behavior Science*, 81(1), 73-88.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00238-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00238-1)
- Millan, J., R. (2000). Neonatal handling, behavior and reproduction in Orange-winged amazons and Cockatiels. *The Zoological Society of London*, 37(1), 220-231.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2000.tb00727.x>
- Pereira, R. J. G., Christofolletti, M. D., Blank, M. H., & Duarte, J. M. B. (2018). Urofecal steroid profiles of captive Blue-fronted parrots (*Amazona aestiva*) with different reproductive outcomes. *General and Comparative Endocrinology*, 260, 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.02.006>
- Prus, S. E., & Schmutz, S. M. (1987). Comparative Efficiency and Accuracy of Surgical and Cytogenetic Sexing in Psittacines. *Avian Diseases*, 31(2), 420–424.
<https://doi.org/10.2307/1590897>

- Ritter, M. (2001). *Amazona autumnalis* (red-lored parrot). *Animal Diversity Web*. Recuperado el 8 de marzo del 2022 de: https://animaldiversity.org/accounts/Amazona_autumnalis/
- Sholty, K. (2006). *Amazona farinosa* (mealy parrot). *Animal Diversity Web*. Recuperado el 8 de marzo del 2022 de: https://animaldiversity.org/accounts/Amazona_farinosa/
- Stavy, M., Gilbert, D., & Martin, R. D. (1979). Routine determination of sex in monomorphic bird species using faecal steroid analysis. *International Zoo Yearbook*, 19(1), 209–214. doi:10.1111/j.1748-1090.1979.tb00566.x
- Tell, L. A. (1997). Excretion and metabolic fate of radiolabeled estradiol and testosterone in the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). *Zoo Biology*, 16(6), 505–518. doi:10.1002/(sici)1098-2361(1997)16:6<505::aid-zoo4>3.0.co;2-e
- Thompson, M. (2010). Immunoanalysis-part 2: basic principles of ELISA. *Analytical Methods Committee Technical Briefs*. 2010;45: 1-2.
- Tseng, T., Gusviputri, A., Quynh-Hoa, L. (2015). A simple, sensitive and compact electrochemical ELISA for estradiol based on chitosan deposited platinum wire microelectrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Volume 758, 1 December 2015, Pages 59-67. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.10.017>.
- Usha M. Joshi; Haresh P. Shah; Govind M. Sankolli (1983). Penicillinase as a marker in enzyme-linked immunosorbent assays for steroid hormones, 19(1-part-P2), 0–421. doi:10.1016/0022-4731(83)90197-8