

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

Determinación del género en aves psitácidas mediante métodos moleculares y análisis de hormonas sexuales en heces

Salomé Milena Alvaro Minda

Medicina Veterinaria

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

Quito, 30 de abril de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Determinación del género en aves psitácidas mediante métodos moleculares
y análisis de hormonas sexuales en heces**

Salomé Milena Alvaro Minda

Nombre del profesor, Título académico

Lenin Vinueza DMVZ, M.Sc,PhD

Quito, 30 de abril de 2024

© 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: Salomé Milena Alvaro Minda

Código: 00211998

Cédula de identidad: 1726606666

Lugar y fecha: Quito, 30 de abril de 2023.

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UNPUBLISHED DOCUMENT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>.

DEDICATORIA

A mi papi, quien cada día se ha sacrificado para darme una educación de calidad y ha estado incondicionalmente a mi lado en cada etapa de mi vida. Gracias por tu amor y por ser mi mayor apoyo.

A mi hermano, mi guía y mi más grande inspiración para superarme. Gracias por mostrarme el camino y motivarme a dar siempre lo mejor.

A mi querido gato Tequila, mi ángel y fuente de alegría. Tu compañía ha sido un consuelo en momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Ramiro Díaz, y a David Valencia, gracias por su orientación y dedicación durante este proyecto. Su experiencia y amabilidad me han ayudado a mejorar y aprender.

A mi amiga María, por su constante apoyo emocional y su disposición a escucharme en los momentos difíciles.

Agradezco también a todas mis mascotas, especialmente a Luna, cuya compañía y cariño me han dado fuerzas en los días más complicados. Su amor incondicional ha hecho este viaje más llevadero.

Finalmente, gracias a todas las personas que de alguna manera han contribuido a mi crecimiento y al éxito de este proyecto. Su apoyo y aliento significan mucho para mí.

RESUMEN

El sexaje de la fauna silvestre es un componente esencial para la conservación y gestión de la biodiversidad a nivel mundial. Identificar el sexo de los animales en su entorno natural es crucial para entender la reproducción, la dinámica poblacional y la salud de las especies. Los métodos tradicionales para el sexaje solían ser invasivos o requerían observar comportamientos específicos durante largos períodos. No obstante, los avances en técnicas moleculares han revolucionado el proceso, permitiendo un sexaje más rápido, preciso y menos invasivo.

Las aves psitácidas, no presentan dimorfismo sexual aparente, en este contexto, la quimioluminiscencia aplicada a la medición de hormonas en heces se presenta como un enfoque no invasivo para el sexaje de psitácidas, brindando una alternativa eficaz a las técnicas genéticas tradicionales. Este método permite identificar el sexo sin necesidad de contención física ni procedimientos agresivos, reduciendo el estrés para los animales y facilitando la gestión ética de estas especies.

La confirmación de resultados mediante métodos moleculares no solo mejora la precisión del sexaje, sino que también permite a científicos y conservacionistas tomar decisiones informadas sobre programas de reproducción y reintroducción de especies en peligro de extinción. El uso de estas técnicas no invasivas permite obtener un sexaje preciso en aves psitácidas y establecer niveles de referencia para estrógenos y testosterona en hembras y machos.

Palabras clave: sexaje de fauna silvestre, conservación, técnicas moleculares, psitácidas, estrés animal, dimorfismo sexual.

ABSTRACT

Sex determination of wildlife is a critical component for the conservation and management of biodiversity worldwide. Identifying the sex of animals in their natural environment is crucial for understanding reproduction, population dynamics, and the overall health of species. Traditional methods of sex determination were often invasive or required observing specific behaviors over long periods. However, advancements in molecular techniques have revolutionized the process, allowing for faster, more accurate, and less invasive sex determination.

Psittacine birds lack apparent sexual dimorphism. In this context, chemiluminescence applied to hormone measurement in feces emerges as a non-invasive approach to determine the sex of psittacine birds, providing an effective alternative to traditional genetic techniques. This method allows for sex identification without physical restraint or aggressive procedures, reducing animal stress and facilitating ethical management of these species.

Confirmation of results through molecular methods not only enhances the accuracy of sex determination but also enables scientists and conservationists to make informed decisions about breeding programs and the reintroduction of endangered species. The use of these non-invasive techniques allows for precise sex determination in psittacine birds and establishes reference levels for estrogen and testosterone in females and males.

Keywords: wildlife sex determination, conservation, molecular techniques, psittacines, animal stress, sexual dimorphism.

TABLA DE CONTENIDO

<i>Introducción</i>	12
<i>Materiales y Métodos</i>	13
<i>Resultados</i>	20
<i>Discusión</i>	30
<i>Conclusiones</i>	31
<i>Referencias bibliográficas</i>	32
<i>Anexo A: Recolección de muestras de heces y plumas en el zoológico san martín de baños</i>	33
<i>Anexo B: analisis de las muestras de heces</i>	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla #1. Identificación de las 10 muestras utilizadas para esta investigación.....	13
Tabla #2. Valores de testosterona en aves psitácidas por medio de Quimioluminiscencia y ELISA.....	15
Tabla #3. Valores de estrógenos en aves psitácidas por medio de Quimioluminiscencia y ELISA.	15
Tabla #4. Resultados de testosterona y estrógenos.....	16
Tabla #5. Conversión de estrógenos de pg/ml a ng/dl.....	22
Tabla #6. Valores de estrógenos y testosterona para obtener el Umbral de referencia....	22
Tabla #7: Especulación de género en base a la mediana de los valores de testosterona y estrógenos.	23
Tabla #8: Muestras de Machos y sus niveles de Testosterona y Estrógenos.....	28
Tabla #9. Valores referenciales de Estrógenos y Testosterona para Machos.....	29
Tabla #10: Muestras de Hembras y sus niveles de Testosterona y Estrógenos.....	29
Tabla #11. Valores referenciales de Estrógenos y Testosterona para Hembras.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura #1. Condiciones de qPCR. Denaturación a 94°C 1 minuto, 40 ciclos (denaturación 94°C 1 minuto; annealing 55°C 30 segundos; extensión 72°C 30 segundos). Una vez concluida la qPCR se para al análisis de curvas de melting (95°C 15 segundo; 60°C 1 minuto; e incrementos de 0.5°C hasta llegar a los 95°C).....	18
Figura #2. Condiciones de qPCR luego del proceso touchdown, las condiciones qPCR fueron 35 ciclos (denaturación a 94°C por 10 segundos; annealing a 50°C por 25 segundos; extensión a 72°C por dos minutos). Una vez concluida la qPCR se para al análisis de curvas de melting (94°C 15 segundos; 55°C 1 minuto; e incrementos de 0.1°C hasta llegar a los 95°C).....	19
Figura #3. Resultados de testosterona (ng/dl) por quimioluminiscencia.....	21
Figura #4. Resultados de estrógenos (pg/ml) por quimioluminiscencia.	21
Figura#5. Analisis de Curvas de melting para la qPCR con el set de primers 2550F/2718R.	24
Figura #6. Análisis de curvas de melting para qPCR con los primers P2/NP/MP. Se observan varios picos de curvas y no se puede valdiar el resultado con la otra qPCR.	25
Figura #7. Análisis de curvas de melting para qPCR con touchdown, con el set de primers 2550F/2718R. Curvas rosadas corresponden a muestras de hembras y curvas azules de machos. La muestra B8 no presentó una curva.	26
Figura #8. Análisis de curvas de melting para qPCR con touchdown, con el set de primers 2550F/2718R. Curva de color naranja corresponde a la muestra B8.2 corresponde a hembra y la curva B3.1 corresponde a una hembra y la curva del pico más alto corresponde a la muestra B6.1 que corresponde a un macho.	26
Figura #9. Gel de electroforesis realizado con el ADN extraído de plumas.....	27

INTRODUCCIÓN

La determinación del sexo en aves psitácidas es un tema crucial dentro del campo de la conservación biológica y la gestión de fauna silvestre. Debido a que estas aves carecen de dimorfismo sexual evidente, identificar el sexo suele ser un proceso complicado (Linares, 2018). Tradicionalmente, se ha recurrido a métodos invasivos o a largos periodos de observación para identificar comportamientos específicos que sugieran el género. Sin embargo, estas aproximaciones pueden inducir estrés y afectar el bienestar de los animales (Bubaker et al., 2011).

En el contexto ecuatoriano, donde la conservación de la biodiversidad es de suma importancia, se necesitan métodos más eficientes para el sexaje de aves. Las aves psitácidas son un grupo diverso y colorido que incluye especies como los guacamayos, loros y periquitos con un alto valor para la conservación y la educación ambiental (Griffiths et al. 1996). Las prácticas invasivas afectan la calidad de vida de estas aves y la precisión en la gestión de programas de cría y reintroducción (Fridolfsson 1999).

Este trabajo aborda este desafío proponiendo un método innovador basado en la técnica de quimioluminiscencia para medir hormonas sexuales en heces, un enfoque no invasivo y menos agresivo que los métodos tradicionales. El estudio se centró en aves psitácidas alojadas en el Zoológico San Martín de Baños y utilizó también métodos moleculares para la confirmación del sexo, proporcionando una alternativa confiable y precisa para el sexaje en esta área.

El trabajo incluye, además, una revisión de antecedentes sobre los métodos de sexaje en aves y la relevancia de estos enfoques en el campo de la conservación. El análisis detallado de las técnicas utilizadas, así como la presentación de resultados, ofrece una guía clara para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de Especies y Muestra:

Se seleccionaron 10 individuos de diferentes especies de aves psitácidas en el Zoológico San Martín de Baños, se realizó su identificación con número de muestra y los 4 últimos dígitos de su chip de identificación (Tabla #1).

Tabla #1. Identificación de las 10 muestras utilizadas para esta investigación.

<i>Identificación</i>	<i>Especie (Nombre Científico)</i>
B1: 6857	<i>Amazona amazonica</i>
B2: 7096	<i>Amazona farinosa</i>
B3: 7102	<i>Pionus menstruus</i>
B4: 7002	<i>Pionus menstruus</i>
B5: 6856	<i>Amazona autumnalis</i>
B6: 7094	<i>Pionus sordidus</i>
B7: 7101	<i>Pionus sordidus</i>
B8: 5563	<i>Pionus sordidus</i>
B9: 6677	<i>Amazona amazonica</i>
B10: 7110	<i>Pionus menstruus</i>

Recolección de Muestras:

Con uso de frascos para recolección de muestras de heces, se tomaron muestras de heces de cada individuo evitando la contaminación, y manteniendo la cadena de frío para evitar la degradación hormonal.

Se tomaron muestras de plumas de cada individuo con sedación inhalatoria (sevoflurano), se recortó una parte del cañón con pinzas y tijeras estériles, para luego colocarlo en reactivo DNA/RNA shield para preservar ADN.

Extracción de ADN:

El ADN se extrajo de las plumas recolectadas, utilizando kits de extracción de tejidos Easy Pure Micro Genomic DNA de Transgen Biotech Co., LTD para muestras con poco ADN, optimizados para maximizar la calidad y cantidad del ADN recuperado.

Determinación de metodología para la prueba de heces con Quimioluminiscencia o ELISA:

Se logró determinar gracias a una prueba piloto de ELISA y Quimioluminiscencia (Tabla 2 y 3), esta última nos brinda resultados más sensibles de testosterona y estrógenos en las muestras, haciendo de este nuestro método a elección para comparación.

La prueba de ELISA fue estandarizada en nuestros laboratorios (Polit, 2022), el estudio propuso medir hormonas esteroideas sexuales en heces de aves psitácidas del género Amazona usando la técnica de ELISA. El proceso de estandarización incluyó pruebas piloto que ajustaron el protocolo para la dilución y homogeneización de las muestras fecales. Las muestras se diluyeron en metanol, homogeneizadas en vórtex, centrifugadas y crio-preservadas antes de medir los niveles de estradiol o testosterona con kits de ELISA específicos. Los resultados se analizaron usando software estadístico para evaluar la normalidad de los datos y calcular valores predictivos de la prueba. A pesar de los esfuerzos por estandarizar la técnica, la investigación concluyó que este método no permite una caracterización sexual concluyente de las aves mediante la medición de estas hormonas.

La prueba de Quimioluminiscencia involucra la medición de hormonas sexuales mediante una técnica inmunológica que detecta la luz emitida por una reacción química entre un anticuerpo específico y un antígeno en la muestra. Los pasos incluyen la recolección de muestras fecales, su preparación y análisis usando reactivos específicos que emiten luz bajo ciertas condiciones. Esta luz se mide y se compara con estándares para determinar la concentración de hormonas, permitiendo inferir el sexo del ave. La quimioluminiscencia es altamente específica y sensible, aunque requiere equipo especializado y costoso.

Tabla #2. Valores de testosterona en aves psitácidas por medio de Quimioluminiscencia y ELISA.

<i>Muestra</i>	Testosterona Quimioluminiscencia	Testosterona ELISA
<i>Paciente 33</i>	0,46 ng/dl	0,14 ng/dl
<i>Paciente 34</i>	0,19 ng/dl	0,18 ng/dl
<i>Paciente 35</i>	0,70 ng/dl	0,13 ng/dl
<i>Paciente 36</i>	0,43 ng/dl	0,18 ng/dl
<i>Paciente 43</i>	0,24 ng/dl	0,10 ng/dl
<i>Paciente 44</i>	2,63 ng/dl	0,16 ng/dl
<i>Paciente 45</i>	0,36 ng/dl	0,17 ng/dl
<i>Paciente 46</i>	0,26 ng/dl	0,12 ng/dl
<i>Paciente 49</i>	0,55 ng/dl	0,29 ng/dl

Tabla #3. Valores de estrógenos en aves psitácidas por medio de Quimioluminiscencia y ELISA.

<i>Muestra</i>	Estrógenos Quimioluminiscencia	Estrógenos ELISA
<i>Paciente 32</i>	915,30 pg/ml	112,00 pg/ml
<i>Paciente 33</i>	812,00 pg/ml	451,00 pg/ml
<i>Paciente 34</i>	829,00 pg/ml	101,00 pg/ml
<i>Paciente 35</i>	815,70 pg/ml	96,00 pg/ml
<i>Paciente 43</i>	1125,60 pg/ml	654,00 pg/ml
<i>Paciente 44</i>	905,60 pg/ml	53,00 pg/ml
<i>Paciente 45</i>	1264,60 pg/ml	100,00 pg/ml
<i>Paciente 46</i>	931,80 pg/ml	225,00 pg/ml
<i>Paciente 49</i>	2176,50 pg/ml	589,00 pg/ml

En esta investigación, se optó por utilizar la técnica de quimioluminiscencia sobre el método ELISA debido a su mayor especificidad y sensibilidad en la detección de hormonas sexuales en muestras fecales de aves (Tabla 4). La quimioluminiscencia, al emplear reactivos que generan una señal luminosa en presencia del antígeno específico, permite una cuantificación más precisa incluso a niveles muy bajos, lo que resulta esencial para asegurar la fiabilidad de los resultados en estudios de determinación sexual. Esta capacidad de detección mejorada es

crucial, especialmente en muestras donde la concentración de hormonas puede ser mínima, proporcionando así una base más sólida y confiable para los análisis y conclusiones de mi tesis.

Tabla #4. Resultados de testosterona y estrógenos

<i>Muestra</i>	Testosterona Quimioluminiscencia	Estrogenos Quimioluminiscencia
B1: 6857	0,39 ng/dl	5,0 pg/ml
B2: 7096	0,19 ng/dl	13,7 pg/ml
B3: 7102	0,73 ng/dl	217,1 pg/ml
B4: 7002	0,16 ng/dl	8,2 pg/ml
B5: 6856	2,3 ng/dl	5,0 pg/ml
B6: 7094	0,52 ng/dl	42,6 pg/ml
B7: 7101	0,32 ng/dl	847,1 pg/ml
B8: 5563	0,32 ng/dl	694,3 pg/ml
B9: 6677	0,32 ng/dl	18,4 pg/ml
B10: 7110	0,33 ng/dl	27,1 pg/ml

Descripción: Resultados de testosterona y estrógenos, realizados con la prueba de quimioluminiscencia, con las muestras de heces tomadas de los individuos utilizados para esta investigación.

qPCR de muestras de plumas:

Las 10 muestras y sus respectivas replicas se encontraban con el preservante DNA/RNA Shield™ de ZYMO Research, y estas fueron conservadas en refrigeración 4°C. Tal y como menciona el protocolo se trabajó con dos porciones de la pluma (cálamo y otra del raquis) que se encontraban en cada uno de los tubos para el proceso de extracción de ADN de las muestras.

1.Extracción de ADN:

El protocolo de extracción se realizó con las muestras que se encontraban con el preservante, es importante mencionar para futuras referencias que el recuperar las plumas de los tubos no fue tan sencillo ya que se trabajó con micropipetas, y recuperar las dos porciones de pluma de cada animal fue un proceso largo, y que en cierta medida fue solventado retirando los 500µL del preservante que se encontraba en cada tubo y así se pudo arrastrar a las porciones de pluma hacia los tubos en donde se realizó la extracción del ADN. Como una recomendación se puede

usar palillos o hisopos estériles para facilitar este paso. En cada tubo se depositaron las dos porciones de pluma y 200 μ L del DNA/RNA Shield™ de ZYMO Research, para recuperar células vestigiales que se hayan desprendido de las plumas. El proceso de extracción se realizó de acuerdo con el protocolo extracción de tejidos del kit EasyPure® Micro Genomic DNA de Transgen Biotech Co., LTD. Para las 10 muestras y se incluyeron a dos muestras de gallo y gallina con el objetivo de tenerlas como controles positivos, el ADN extraído de las muestras fue eluido a un volumen de 40 μ L.

2.PCR:

Se realizaron 2 PCR una con los primers: 2550F (5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA3') y 2718R (5'ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') y otra PCR con los primers: P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT3'); NP (5'-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3'); y MP (5'-AGTCACTACTAGATCCGGAA-3'), todos los primers se usaron en una concentración final de 0.2 μ M.

Es importante mencionar que contamos con dos sets de primers para la determinación de sexo en aves: 1) 2550F/2718R y 2) P2/NP/MP (Srikijkasemwat, 2021). Se realizaron dos qPCR con cada set, de lo que reporta la literatura deben salir los mismos resultados y ambos PCR se validan entre sí, pero durante el trabajo nos percatamos que la secuencia del primer MP reportada por el artículo que se basaron para sintetizar los primers (Srikijkasemwat, 2021), presenta un error en la secuencia correcta del artículo original (Hideyuki Ito, 2003), posiblemente un error de tipeo al publicar el artículo, esto lo descubrimos al realizar alineaciones in silico de los primers usando el software Molecular Evolutionary Genetics Analisis (MEGA, versión 11.0.13) y ya que los resultados de ambos qPCR no presentaban los resultados esperados. Una vez recibidos los resultados del gel mencionado más adelante en la sección de resultados se pudo corroborar que los resultados obtenidos usando el set de primers

1) permitió realizar con éxito la determinación del sexo de las aves psitácidas. A continuación, tenemos a detalle la metodología empleada para realizar los análisis y los resultados obtenidos. La reacción con el set de primers 2550F/2718R tuvo un volumen final de 10 μ L (5 μ L de TransStart® Tip Green qPCR supermix; 0,30 μ L de cada primer; 2,40 μ L de H₂O; y 2.0 μ L de ADN). Por otro lado, la reacción con el set de primers P2/NP/MP tuvo un volumen final de 10 μ L. (5 μ L de TransStart® Tip Green qPCR 3 supermix; 0,20 μ L de cada primer; 2,40 μ L de H₂O; y 2 μ L de ADN). En la figura 1 encontramos las condiciones de la qPCR para ambas reacciones.

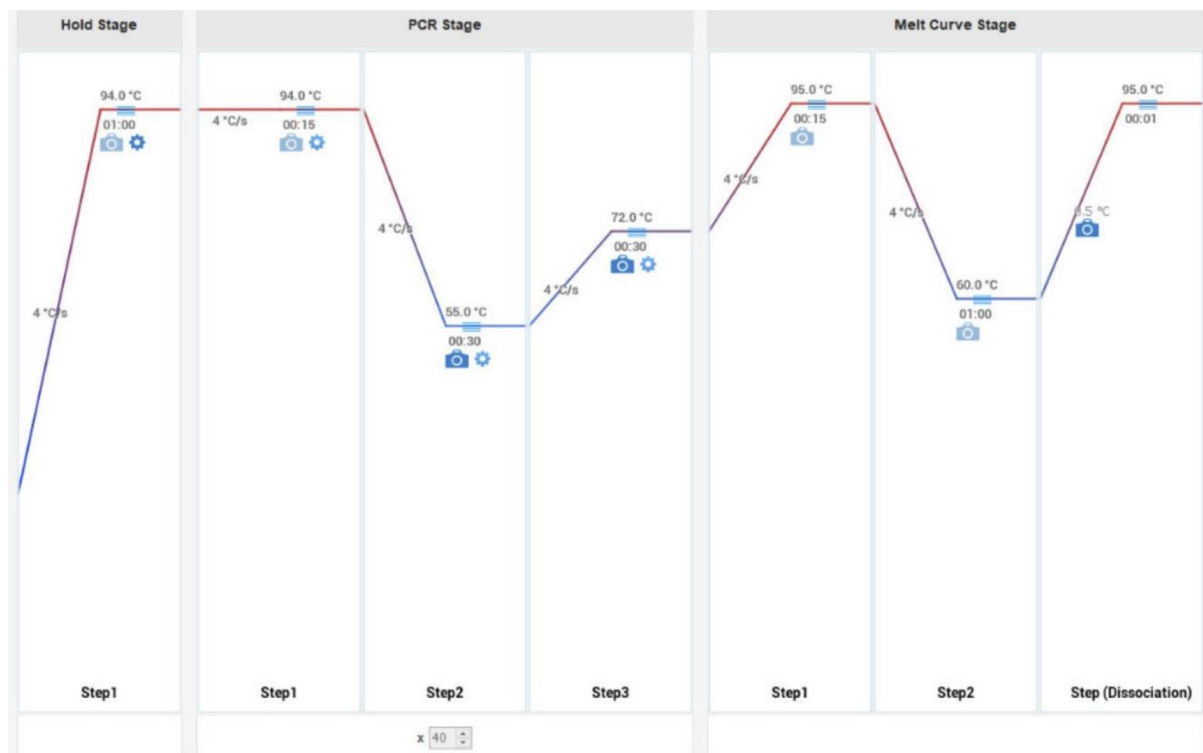


Figura #1. Condiciones de qPCR. Denaturación a 94°C 1 minuto, 40 ciclos (denaturación 94°C 1 minuto; annealing 55°C 30 segundos; extensión 72°C 30 segundos). Una vez concluida la qPCR se para al análisis de curvas de melting (95°C 15 segundo; 60°C 1 minuto; e incrementos de 0.5°C hasta llegar a los 95°C).

Luego de evaluar los resultados del gel de electroforesis las condiciones del PCR optimizada fueron las siguientes: La reacción con el set de primers 2550F/2718R tuvo un volumen final de

10 μ L (5 μ L de TransStart® Tip Green qPCR supermix; 0,30 μ L de cada primer; 1,90 μ L de H₂O; y 2.5 μ L de ADN). Para optimizar las curvas de melting se realizó una PCR Touchdown, que consiste en reducir la temperatura de annealing 1°C por cada ciclo (en los primero 10 ciclos de amplificación), desde 60°C a 51°C, y posteriormente realizar 35 ciclos de amplificación con a una temperatura de annealing de 50°C (Fridolfsson, 1999). Las condiciones de la qPCR se pueden observar en la Figura #2.

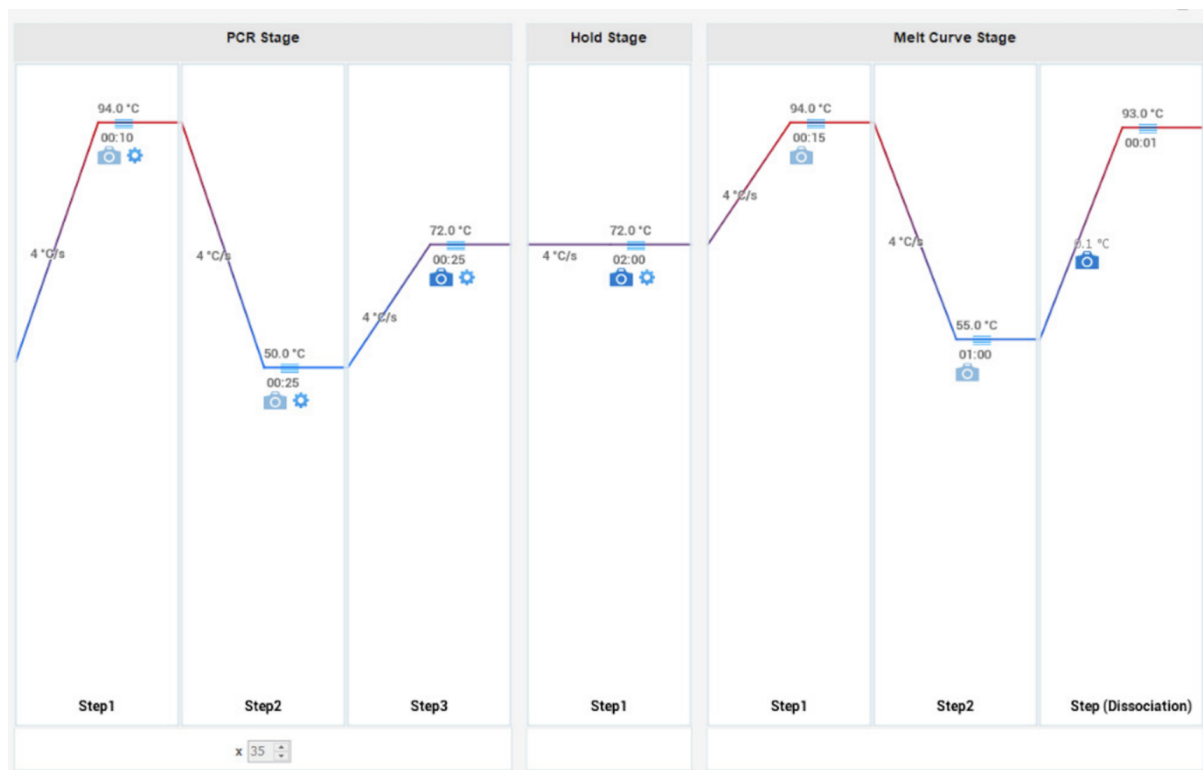


Figura #2. Condiciones de qPCR luego del proceso touchdown, las condiciones qPCR fueron 35 ciclos (denaturación a 94°C por 10 segundos; annealing a 50°C por 25 segundos; extensión a 72°C por dos minutos). Una vez concluida la qPCR se para al análisis de curvas de melting (94°C 15 segundos; 55°C 1 minuto; e incrementos de 0.1°C hasta llegar a los 95°C).

3. Gel de electroforesis:

Se realizó un gel con una concentración de 3% de agarosa con de SYBR safe, 4 μ L de cada amplicon fueron cargados, de la primera qPCR con los 2 sets de primers y se corrió el gel por 50 minutos a 80 voltios.

RESULTADOS

En la búsqueda de estrategias efectivas para determinar el sexo en aves psitácidas, este estudio propone un método no invasivo con el potencial de transformar el enfoque actual en zoología y conservación. La quimioluminiscencia, una técnica bioanalítica que detecta luz emitida por reacciones químicas específicas, destaca por su sensibilidad y especificidad, especialmente cuando se trata de medir hormonas sexuales en muestras de heces.

Los resultados obtenidos comparan la quimioluminiscencia con el método ELISA, evidenciando la superioridad de la primera para medir testosterona y estrógenos en heces de aves psitácidas del género *Amazona* y *Pionus*, seleccionadas del Zoológico San Martín de Baños. El estudio incluyó una cuidadosa recolección y preservación de muestras para evitar la degradación hormonal.

Los resultados obtenidos muestran una correlación significativa entre los métodos evaluados y sugieren que la quimioluminiscencia es una alternativa menos invasiva y más confiable que las pruebas de ELISA estándar para el sexado de aves psitácidas. Estos hallazgos resaltan la importancia de las técnicas de preservación y análisis molecular en el campo del sexado de aves, proporcionando una base sólida para futuras investigaciones y programas de conservación.

La sección de resultados que sigue a esta introducción examina detalladamente estos métodos, discute su relevancia práctica y explora las implicaciones para el bienestar animal y la conservación de especies en peligro.

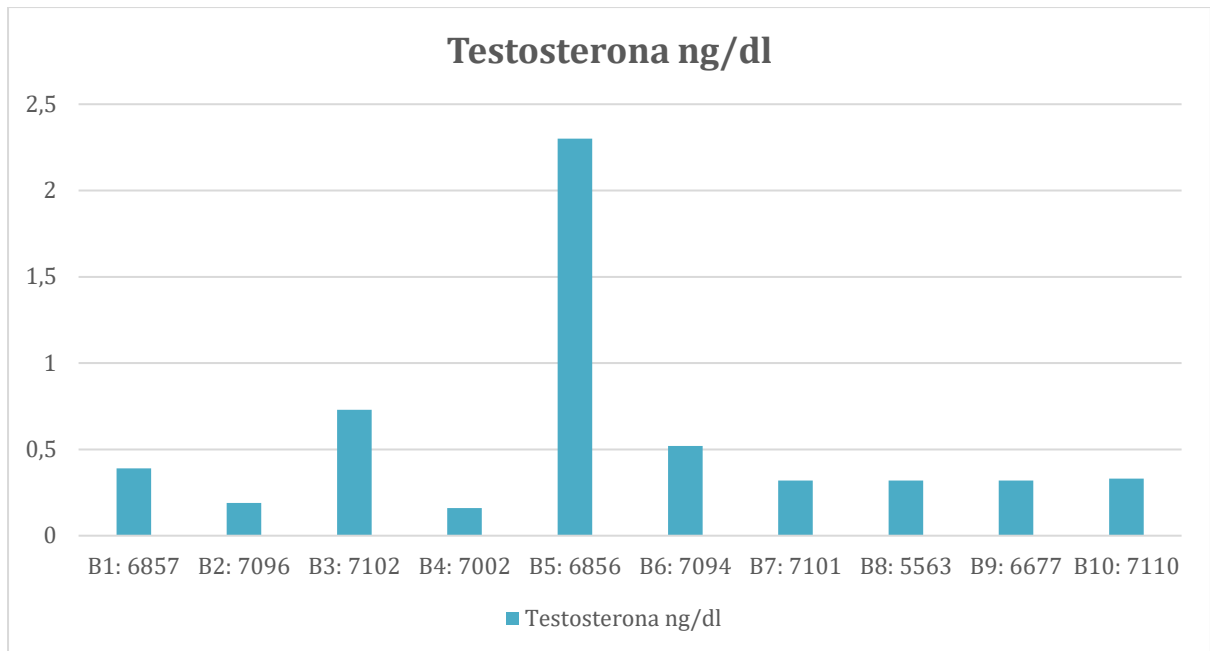


Figura #3. Resultados de testosterona (ng/dl) por quimioluminiscencia.

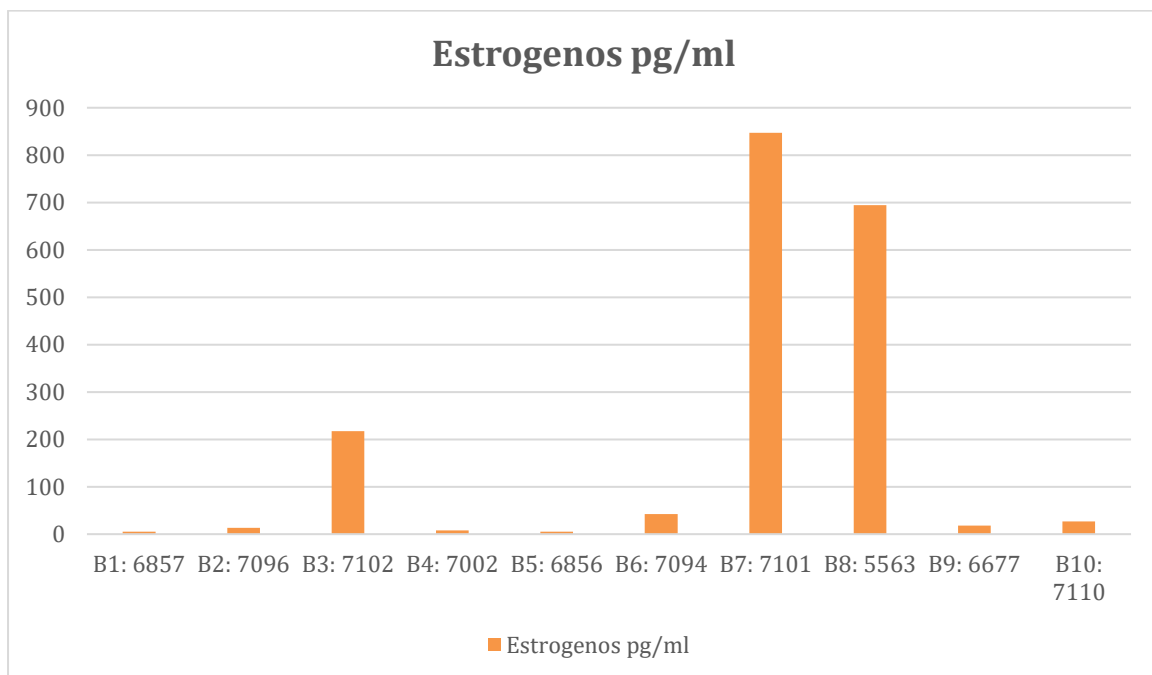


Figura #4. Resultados de estrógenos (pg/ml) por quimioluminiscencia

Tabla #5. Conversión de estrógenos de pg/ml a ng/dl

<i>Muestra</i>	Estrógenos pg/ml	Estrógenos ng/dl
B1: 6857	5.0	0.0050
B2: 7096	13.7	0.0137
B3: 7102	2171	0.2171
B4: 7002	8.2	0.0082
B5: 6856	5.0	0.0050
B6: 7094	42.6	0.0426
B7: 7101	8471	0.8471
B8: 5563	694.3	0.6943
B9: 6677	18.4	0.0184
B10: 7110	271	0.0271

Basándonos en los estadísticos descriptivos de los resultados, podemos establecer umbrales de referencia preliminares para testosterona y estrógenos. Estos umbrales pueden ser útiles para diferenciar entre machos y hembras.

Tabla #6. Valores de estrógenos y testosterona para obtener el Umbral de referencia

<i>Valores</i>	Estrógenos ng/dl	Testosterona ng/dl
Media	0.188 ng/dl	0.558 ng/dl
Desviación estándar (SD)	0.316 ng/dl	0,633 ng/dl
Mínimo	0.005 ng/dl	0,160 ng/dl
Máximo	0.847 ng/dl	2.300 ng/dl
Umbral de referencia (50%)	0.023 ng/dl	0.325 ng/dl

Descripción: Se propone un umbral de referencia para la testosterona y los estrógenos basándonos en la mediana (50% percentil), ya que es menos sensible a los valores extremos que la media.

Estos umbrales sugieren que un ave con un nivel de testosterona superior a 0.325 ng/dl podría considerarse dentro del rango típico de un macho, mientras que un ave con un nivel de estrógenos superior a 0.023 ng/dl podría considerarse dentro del rango típico de una hembra.

Tabla #7: Especulación de género en base a la mediana de los valores de testosterona y estrógenos.

<i>Muestra</i>	Testosterona ng/dl	Estrógenos ng/dl	Presunto Sexo
B1: 6857	0.39	0.005	Macho
B2: 7096	0.19	0.014	Indeterminado
B3: 7102	0.73	0.217	Hembra
B4: 7002	0.16	0.008	Indeterminado
B5: 6856	2.3	0.005	Macho
B6: 7094	0.52	0.043	Macho
B7: 7101	0.32	0.847	Hembra
B8: 5563	0.32	0.694	Hembra
B9: 6677	0.32	0.018	Indeterminado
B10: 7110	0.33	0.027	Hembra

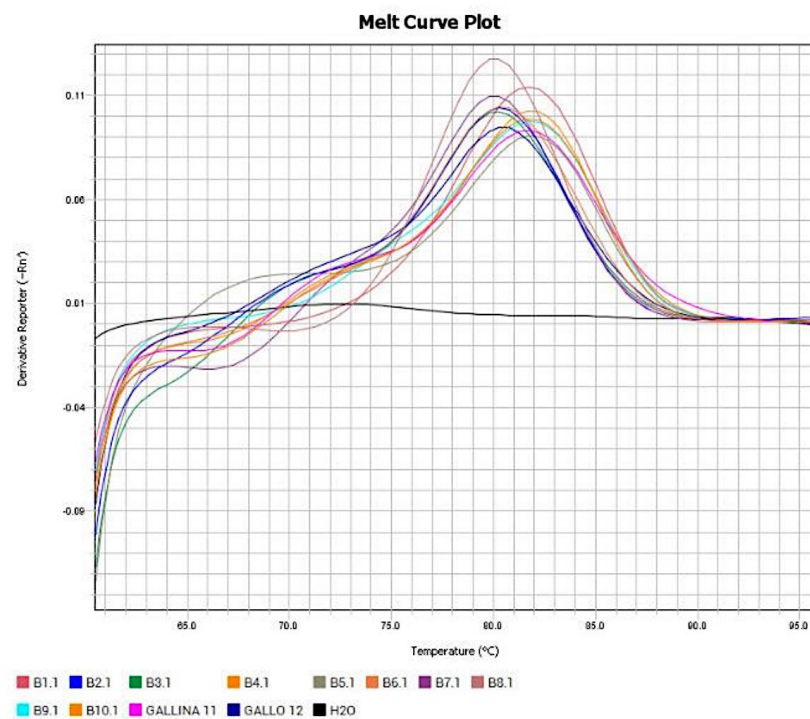
Descripción: Las clasificaciones marcadas como "Indeterminado" son aquellas en las que ni el nivel de testosterona ni el nivel de estrógenos superan la mediana, lo que no permite una asignación clara según el criterio establecido.

Con la finalidad de confirmar aquellas asignaciones "Indeterminadas", se realizaron diversas pruebas para determinar el sexo en aves psitácidas a través de la detección de ADN en plumas y la medición hormonal en heces. El estudio se centró en la detección del sexo en aves psitácidas mediante métodos moleculares, combinando análisis de qPCR y gel de electroforesis para obtener resultados precisos. Se realizaron experimentos con dos conjuntos de primers para determinar la eficacia en la identificación del sexo de varias muestras de plumas y compararlos con controles positivos y negativos. A continuación, se detallan los resultados obtenidos mediante técnicas moleculares y análisis de electroforesis en gel.

Resultados de qPCR con Primers 2550F/2718R:

La literatura que describe el uso de los primer 2550F / 2718R para la detección de sexos en aves, indica que en varias especies de aves analizadas, los machos (ZZ) amplifican solo 1

fragmento del gen CDH1Z con un tamaño de 600pb; mientras que las hembras (WZ) generan 2 fragmentos: 1 del gen CDH1W de 450 pb y 1 fragmento del gen CDH1Z de 600pb (Fridolfsson, 1999). En la Figura #5 se observan los resultados de la primera PCR en donde se observa una diferencia en los picos de las curvas de melting (Tm) un grupo de curvas generan un pico en 79°C y el otro grupo a 82°C. Los resultados de la otra PCR (P2/MP/NP) con el triplete de primers no fue 5 concluyente (Figura #6) se procedió a realizar el gel de electroforesis para poder corroborar estos resultados.



Figura#5. Analisis de Curvas de melting para la qPCR con el set de primers 2550F/2718R.

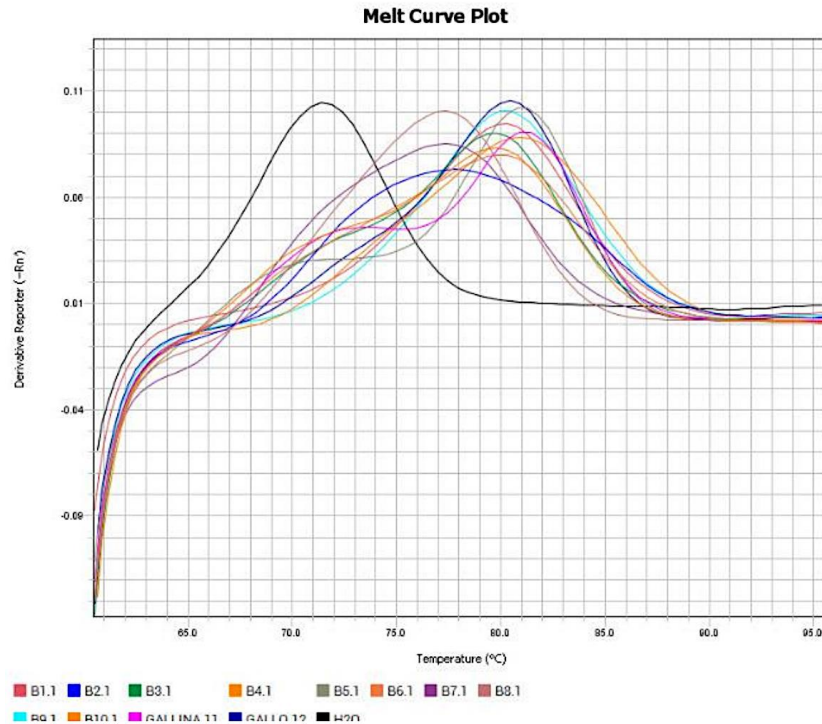


Figura #6. Análisis de curvas de melting para qPCR con los primers P2/NP/MP. Se observan varios picos de curvas y no se puede validar el resultado con la otra qPCR.

Resultados de PCR Touchdown con Primers 2550F/2718R

En la figura #7 se observa los resultados de las curvas de melting para la PCR touchdown en donde se nota que las curvas que tienen color rosado son más pequeñas y estas corresponden a hembras mientras que los picos más altos son muestras identificadas como machos (curvas azules). La muestra B8 no amplificó, se presume una posible degradación del ADN. En la figura #8 se observa los resultados de la PCR luego de haber realizado una nueva extracción de ADN de la muestra 8, adicionalmente se corrió una muestra de hembra y otra de macho previamente identificadas en el gel de electroforesis y curvas previas.

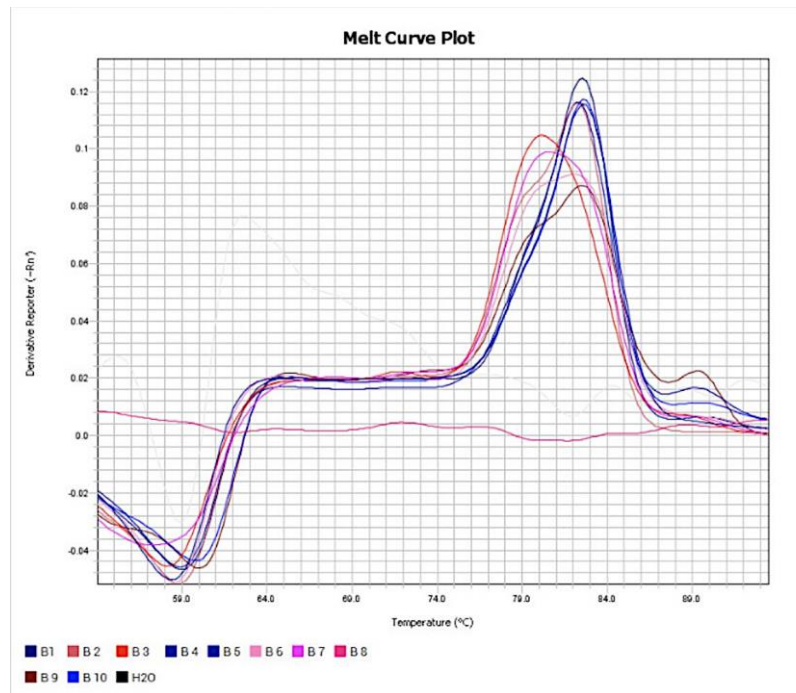


Figura #7. Análisis de curvas de melting para qPCR con touchdown, con el set de primers 2550F/2718R. Curvas rosadas corresponden a muestras de hembras y curvas azules de machos. La muestra B8 no presentó una curva.

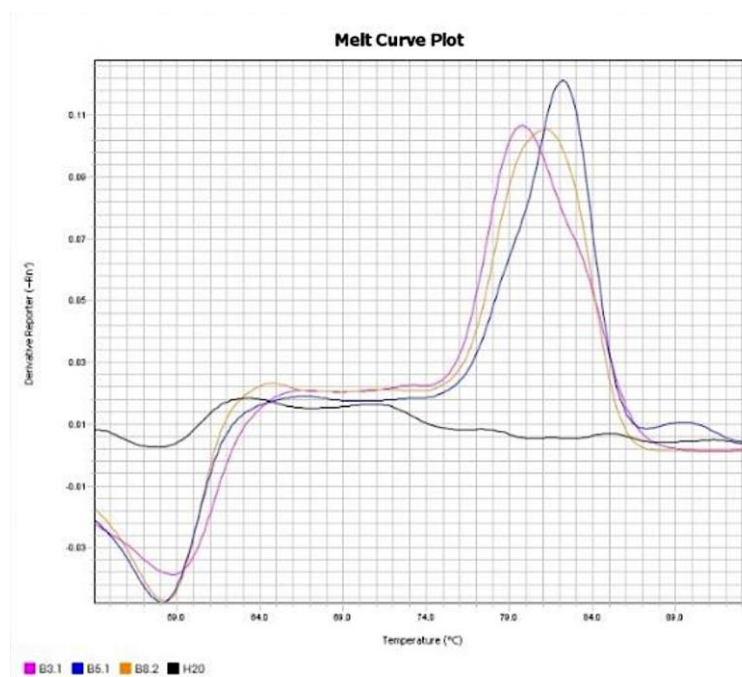


Figura #8. Análisis de curvas de melting para qPCR con touchdown, con el set de primers 2550F/2718R. Curva de color naranja corresponde a la muestra B8.2 corresponde a hembra y la curva B3.1 corresponde a una hembra y la curva del pico más alto corresponde a la muestra B6.1 que corresponde a un macho.

Resultados de Gel de Electroforesis

Para corroborar los resultados obtenidos mediante qPCR y PCR Touchdown, se realizó un análisis por electroforesis en gel. Se utilizó un gel de agarosa al 3%, y las muestras se corrieron durante 50 minutos a 80 voltios.

En este estudio, se empleó esta técnica para identificar el sexo de varios especímenes de aves, comparando los resultados obtenidos con controles positivos y negativos. Los resultados obtenidos se presentan a continuación, mostrando la correlación entre el número de bandas en el gel y el sexo de los especímenes.

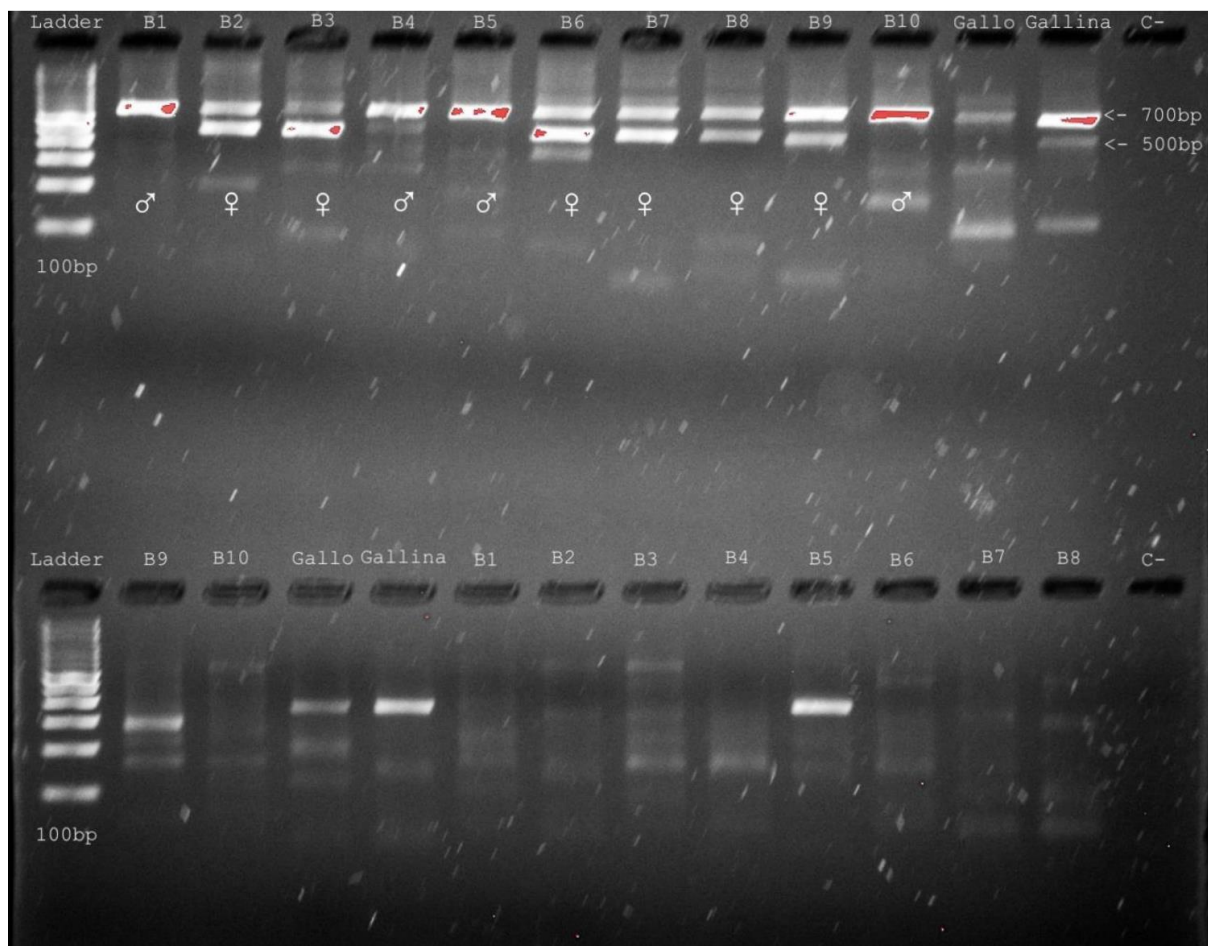


Figura #9. Gel de electroforesis. Muestras de B1 a B10 más controles positivos Gallo y Gallina. Arriba PCR con primers 2550F/2718R, la presencia de una banda indica la

identificación de un macho y la de dos bandas de una hembra; Abajo PCR con primers P2/NP/MP.

Controles Positivos y Negativos: El control positivo del gallo tiene una sola banda, y el control positivo de la gallina tiene dos bandas. El control negativo no muestra bandas, como se esperaba.

Muestras y Determinación del Sexo:

Los individuos que muestran una sola banda (como el Individuo B1:6857) son identificados como machos. Los individuos que presentan dos bandas (como el Individuo B3:7102) son identificados como hembras. Estos resultados indican que la electroforesis en gel es efectiva para la determinación del sexo en aves psitácidas, permitiendo identificar machos y hembras según la cantidad de bandas obtenidas en el gel.

Validación de Resultados y Consistencia

La correlación entre los resultados obtenidos por qPCR y los confirmados por electroforesis en gel demostró la eficacia de los métodos utilizados. Además, el proceso de PCR Touchdown mejoró la consistencia de los resultados, permitiendo identificar de manera clara el sexo y los niveles de testosterona y estrógenos de las aves psitácidas como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla #8: Muestras de Machos y sus niveles de Testosterona y Estrógenos

<i>Muestra</i>	Nivel de Testosterona ng/dl	Nivel de Estrógenos pg/ml	Resultado qPCR
<i>B1: 6857</i>	0.39 ng/dl	5.0 pg/ml	Macho
<i>B4: 7002</i>	0.16 ng/dl	8.2 pg/ml	Macho
<i>B5: 6856</i>	2.3 ng/dl	5.0 pg/ml	Macho
<i>B10: 7110</i>	0.33 ng/dl	27.1 pg/ml	Macho

Tabla #9. Valores referenciales de Estrógenos y Testosterona para Machos

<i>Valores</i>	Testosterona ng/dl	Estrógenos pg/ml
<i>Media</i>	0.795 ng/dl	11.325 pg/ml
<i>Desviación estándar (SD)</i>	1.008 ng/dl	10.624 pg/ml
<i>Mínimo</i>	0.16 ng/dl	5.0 pg/ml
<i>Máximo</i>	2.3 ng/dl	27.1 pg/ml
<i>Rango de referencia</i>	-1.22 ng/dl a 2.81 ng/dl	-9.92 pg/ml a 32.57 pg/ml

Tabla #10: Muestras de Hembras y sus niveles de Testosterona y Estrógenos

<i>Muestra</i>	Nivel de Testosterona ng/dl	Nivel de Estrógenos pg/ml	Resultado qPCR
<i>B2: 7096</i>	0.19 ng/dl	13.7 pg/ml	Hembra
<i>B3: 7102</i>	0.73 ng/dl	217.1 pg ml	Hembra
<i>B6: 7094</i>	0.52 ng/dl	42.6 pg/ml	Hembra
<i>B7: 7101</i>	0.32 ng/dl	847.1 pg/ml	Hembra
<i>B8: 5563</i>	0.32 ng/dl	694.3 pg/ml	Hembra
<i>B9: 6677</i>	0.32 ng/dl	18.4 pg/ml	Hembra

Tabla #11. Valores referenciales de Estrógenos y Testosterona para Hembras

<i>Valores</i>	Testosterona ng/dl	Estrógenos pg/ml
<i>Media</i>	0.400 ng/dl	269.47 pg/ml
<i>Desviación estándar (SD)</i>	0.193 ng/dl	391.48 pg/ml
<i>Mínimo</i>	0.19 ng/dl	0.73 pg/ml
<i>Máximo</i>	0.73 ng/dl	847.10 pg/m
<i>Rango de referencia</i>	0.01 ng/dl a 0.79 ng/dl	-513.49 pg/ml a 1052.43 pg/ml

La clasificación de los resultados obtenidos mediante qPCR y electroforesis en gel en grupos de machos y hembras permitió obtener valores referenciales de estrógenos y testosterona. Estos valores serán útiles para futuras confirmaciones utilizando solo la prueba de quimioluminiscencia.

DISCUSIÓN

Este estudio muestra que la quimioluminiscencia es significativamente más sensible y precisa que el método ELISA para medir testosterona y estrógenos en heces de aves psitácidas. Este hallazgo es crucial, ya que permite determinar el sexo de aves sin dimorfismo sexual evidente de manera confiable y no invasiva, reduciendo el estrés asociado con procedimientos agresivos y la contención física.

Al comparar nuestros resultados con estudios previos, como el de Linares (2018) y Brubaker et al. (2011), se observa que los niveles de testosterona y estrógenos obtenidos en nuestro estudio son consistentes con los rangos reportados en aves similares. En particular, los niveles de testosterona detectados mediante quimioluminiscencia fueron considerablemente más altos y más precisos que los obtenidos por ELISA (Tabla #2 y #3).

Comparando estos valores con los reportados por Linares (2018), se observa que nuestros resultados son congruentes con los niveles de hormonas sexuales en aves psitácidas similares. Por ejemplo, Linares reporta niveles de testosterona que oscilan entre 0.15 y 2.5 ng/dl y niveles de estrógenos que varían entre 5 y 850 pg/ml. Nuestros hallazgos también están en línea con lo observado por Brubaker et al. (2011), quienes destacaron la capacidad de la quimioluminiscencia para detectar niveles hormonales con mayor precisión que el ELISA.

Es importante mencionar que, a pesar de la complejidad para obtener ADN de plumas, el uso del kit Easy Pure® Micro Genomic DNA de Transgen Biotech Co. LTD. permitió obtener

ADN de alta calidad y buena concentración, adecuado para los ensayos. La optimización del proceso mejoró las curvas de melting, diferenciando claramente entre machos y hembras. Los resultados de las curvas de melting con los primers 2550F/2718R y el análisis de electroforesis en gel confirmaron la identificación del sexo, mostrando consistencia y repetibilidad en las pruebas.

Finalmente, los valores referenciales de testosterona y estrógenos obtenidos para machos y hembras (Tabla #9 y #11), proporcionan una base sólida para futuras investigaciones, facilitando la aplicación de la quimioluminiscencia como método no invasivo en el sexaje de aves psitácidas. Este avance es significativo para la zoología y la conservación, permitiendo un manejo más eficaz de estas especies.

CONCLUSIONES

El estudio mostró que la quimioluminiscencia es más sensible y precisa que ELISA para medir testosterona y estrógenos en muestras de heces, lo que facilita el sexaje de aves psitácidas, un grupo sin dimorfismo sexual evidente. La correlación entre los resultados obtenidos por quimioluminiscencia y métodos moleculares como qPCR y gel de electroforesis proporciona una base sólida para su uso en estudios de sexaje de aves psitácidas.

Para estudios futuros, sugeriría explorar la aplicación de la quimioluminiscencia en otras especies de aves y en diferentes contextos, para validar su eficacia y alcance. También sería valioso investigar otras técnicas no invasivas para el sexaje de aves y comparar su precisión y practicidad con métodos invasivos tradicionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brubaker, J. L., Karouna-Renier, N. K., Chen, Y., Jenko, K., Sprague, D. T., & Henry, P. F. P. (2011). A noninvasive, direct real-time PCR method for sex determination in multiple avian species. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 415-417. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02951.x>
- Fridolfsson, A.-K. (1999). A simple and universal method for molecular sexing of nonratite birds. *JOURNAL OF AVIAN BIOLOGY* 30, 116-121. doi:doi.org/10.2307/3677252
- Griffiths, R., Serge, D., Cor, D. (1996) Sex identification in birds using two CHD genes. Department of Genetics, Cambridge.
- Hideyuki It., Sudo-Yamaji, A., Abe, M., Murase, T., & Tsubota, T. (2003). Sex Identification by Alternative Polymerase Chain Reaction Methods in Falconiformes. *Zoological Science*, 20(3), 339-344. <https://doi.org/10.2108/zsj.20.339>
- Linares, P. (2018). Determinación sexual de aves mediante métodos moleculares.
- Polit, R. (2022). 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. Universidad San Francisco de quito.
- Silva, S. T. D. D., Pagthinathan, M., Bandara, S., & Pathirana, I. N. (2023). Sex identification methods of birds: A review. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 9(4), 134-144. <https://doi.org/10.3329/ajmbr.v9i4.69414>
- Srikijkasemwat, P. K. (2021). Efficacy of two primer sets used in the sex identification of rufous-winged buzzard (*Butastur liventer*). *Open Veterinary Journal*, 581–586. doi: 10.5455/OVJ.2021.v11.i4.7

ANEXO A: RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE HECES Y PLUMAS EN EL ZOOLOGICO SAN MARTÍN DE BAÑOS.



ANEXO B: ANALISIS DE LAS MUESTRAS DE HECES.

