

LA CITOGENÉTICA COMO HERRAMIENTA EN EL SEXAJE DE AVES

Stelle C,^a Jiménez LM^{bd} y Sánchez CA^{cd}

^a M.V., UN. Correo electrónico: csveterinaria@yahoo.es

^b MV. M.Sc. Profesora Asociada Universidad Nacional de Colombia. Correo e: dlmjimene@unal.edu.co

^c MV. M.Sc (c). UN. Correo e: casanchezi@hispavista.com

^d Laboratorio de Citogenética, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.

Resumen. Se llevo a cabo el análisis cromosómico de 32 individuos en cautiverio del género *Ara*: 9 de la especie *A. macao*, 10 *A. ararauna*, 9 *A. chloroptera* y 4 individuos *A. militaris*, con el fin de detectar posibles polimorfismos o anomalías cromosómicas y lograr la identificación del sexo en estas especies carentes de dimorfismo sexual fenotípico aparente, esto a partir de linfocitos obtenidos de cultivos de sangre periférica y mediante las técnicas de bandeó C.

Se encontró un número modal de 12 pares de macrocromosomas (incluyendo el par sexual) en las cuatro especies. Se obtuvo la longitud relativa y relación de brazos de cada uno de los macrocromosomas a partir de sus mediciones con el fin de identificar cada uno de los pares cromosómicos, el par 1 es metacéntrico, los pares 2 al 6 son subteloecéntricos, 7 al 11 metacéntricos, los cromosomas sexuales Z y W son metacéntricos en todas las especies pero muestran una marcada diferencia de tamaño entre ellos, los demás son microcromosomas.

Todos los cromosomas contienen una región de heterocromatina constitutiva en el centrómero, el cromosoma W y los microcromosomas están compuestos casi en su totalidad por este material. Finalmente se concluye que ésta técnica representa una herramienta valiosa para realizar el sexaje de éstas especies carentes de dimorfismo sexual fenotípico aparente.

Palabras clave. Psitácidos, bandeó C, sexaje aviar, heterocromatina constitutiva.

Cytogenetic Like Tool in Sexing Birds

Abstract. Chromosomal analysis of 32 individuals in captivity of genus *Ara* (9 *A. macao*, 10 *A. ararauna*, 9 *A. chloroptera* and 4 *A. militaris*), was made in order to detect possible polymorphisms or chromosomal abnormalities and to obtain the identification of sex in these species devoid of sexual dimorphism, this from lymphocytes culture and chromosome C banding.

A modal number of 12 macrochromosomes couples (including the sexual couple) was found in four species. It was obtained the relative longitude and relationship of arms of each one of macrochromosomes starting from their measurement with purpose to identifying each one of chromosomal couples. Pair 1 is metacentric, pairs 2 to 6 are subtelocentric, pairs 7 to 11 are metacentric, and sexual chromosomes Z and W are metacentric in all species but they show a marked size difference among them, the other ones are microchromosomes.

All chromosomes contain a region of constituent heterochromatin in the centromere, W chromosome and microchromosomes are compound almost in their entirety for this material. Finally we concluded that this technique represents a valuable tool to carry out sexing of these species without sexual dimorphism apparent.

Keywords. Psittacines, C banding, sexing birds, constitutive heterochromatin.

En el territorio colombiano se encuentran una gran cantidad de especies de aves, entre ellas, se calcula que existen aproximadamente 52 especies de la familia *Psittacidae*, encontrándose en el segundo puesto después de Brasil.¹⁴

En Colombia el género *Ara* comprende 8 especies de las cuales, cuatro se encuentran en los listados de CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de

Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres),³ entidad que regula la importación y exportación a nivel mundial de las especies amenazadas. *Ara chloroptera* y *Ara macao* se encuentran en el apéndice II de este manual, mientras que *Ara ararauna* y *Ara militaris* se localizan en el apéndice I, es decir, en vía de extinción inminente, esto debido al incremento en los frentes de colonización, la deforestación y la contaminación ambiental, principales factores que producen la disminución de

hábitats naturales.¹³ Otro factor importante que genera una reducción en el número de individuos es la explotación indiscriminada para el comercio de mascotas: el tráfico ilegal de animales, ya que en Colombia se encuentran los principales proveedores de fauna silvestre de los mercados internacionales. Las estadísticas revelan que de la región amazónica se extraen anualmente cerca de 4 millones de individuos de diferentes especies de fauna silvestre, incluyendo un número elevado de aves, que diariamente son víctimas del maltrato y el abuso, lo cual compromete las opciones de libertad y supervivencia en su medio ambiente natural.¹⁶

Esta creciente preocupación en torno al deterioro del recurso fauna, ha contribuido a fomentar la búsqueda de alternativas a través de la investigación básica que propicien y promuevan un aprovechamiento sostenible del mismo y que permitan además el mantenimiento de nuestro patrimonio faunístico, resaltando la necesidad de promover estudios que hagan parte de estrategias fundamentales para la conservación, como el análisis del sexo en individuos que harán parte de programas de cría y reproducción en cautiverio.⁴

En la gran mayoría de especies del orden *Psittaciformes*, no se encuentra dimorfismo sexual fenotípico aparente entre los dos sexos; por este motivo se han desarrollado técnicas que llevan al diagnóstico del sexo en individuos que van a ser objeto de estudio, cría o utilizados en programas de reproducción en cautiverio. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran la laparoscopia, con la cual se busca identificar visualmente los órganos sexuales de las aves, ésta técnica presenta una alta confiabilidad pero a la vez es la más invasiva y en la que más peligro corre la vida del paciente. Determinar la presencia del cromosoma Z en el individuo por medio de la genética molecular, empleando microsátélites es una técnica altamente específica pero que presenta algunos inconvenientes como el hecho de no estar estandarizada la prueba en todos los países, lo que aumenta notablemente los costos para llevarla a cabo. La citogenética nos da herramientas para determinar la presencia de uno o de los dos cromosomas sexuales en el carioti-

po de las aves que se estudien con esta técnica, es una prueba poco invasiva y económica.²¹

CITOGENÉTICA AVIAR

Los estudios cromosómicos en aves quizás presenten inconvenientes al análisis, debido a las dificultades para el conteo de los microcromosomas (los cuales constituyen una gran parte del cariotipo), esto hace que no haya certeza total acerca del número diploide exacto de las especies analizadas. Otro problema, son los cultivos de células aviares, los cuales no han sido tan efectivos como los cultivos en células mamíferas. Adicionalmente no hay reglas específicas para la separación entre macro y microcromosomas y en ocasiones el pequeño tamaño de los microcromosomas ha hecho difícil su análisis al microscopio de luz.^{18, 23, 26, 29}

Los cromosomas sexuales juegan un papel importante en los estudios comparativos entre especies aviares. En las aves los dos sexos están claramente diferenciados desde el punto de vista genético. El sexo de las aves está determinado por la presencia del cromosoma W, descubierto por Frederic hacia 1961. Esto permitió establecer que en las aves hay dimorfismo cromosómico sexual, dentro del cual el macho es homogamético (ZZ) y la hembra es heterogamética (ZW). Posibles dificultades en el estudio de estos cromosomas se atenuaron con la introducción de nuevas técnicas (bandeo C).¹⁸

La técnica de bandeo C señala por medio de una tinción especial la presencia de heterocromatina constitutiva en un cromosoma (regiones condensadas e inactivas). Esta técnica demostró ser la más útil para identificar el cromosoma W de las aves comunes, por cuanto estos se teñían más que las otras estructuras. El primer reporte de un patrón de heterocromatina constitutiva en aves (Bandas C) fue realizado por Stephos y Arrigui en 1971. Las ocho especies estudiadas, pertenecientes al orden de los *Galliformes* y la familia *Cracidae* presentaron regiones de bandas C positivas a nivel de los microcromosomas y del cromosoma sexual W, este último presentó un aspecto característico, era pequeño y se teñía casi totalmente con gran intensidad.²⁵

Otros reportes de este hallazgo en diferentes órdenes y especies fueron: Género *Larus* sp, *Crax mitu*, *Ciconiiformes*, *Galliformes* y *Anseriformes*, *Aquila adalberti*, *Gallus domesticus*, *Aratinga* sp, *Forpus xanthopterygius*, *Amazona* sp, y *Columbiformes*.^{2, 5, 6, 9, 10, 12, 17, 19, 20, 22, 26, 30, 31}

Inicialmente se pensó que estas características, que habían sido observadas en el W de especies comunes como el *Gallus domesticus*, eran propias de todas las aves, y que siempre el cromosoma W era pequeño y totalmente heterocromático. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que este no era el caso. Este cromosoma mostraba variaciones significativas entre las aves comunes y las paleognatas conformadas por ñandúes, avestruces y otras aves corredoras. Estas diferencias permitían separar nítidamente a estas aves primitivas de sus congéneres más recientes, las especies de aves neognatas.¹

Los *Psittaciformes* pertenecen al grupo de aves designadas como *Neognatas* las cuales constituyen el 99% de las especies de aves vivientes, el otro grupo son la llamadas *Paleognatas* o aves de paladar ancestral, que son consideradas más primitivas; estudios han mostrado que las principales diferencias no radican únicamen-

te en su fenotipo, también esta involucrada la morfología de sus cromosomas sexuales (Figura 1: muestra las diferencias existentes entre los cromosomas sexuales de las aves *Paleognatas* y *Neognatas*).^{1,18}

Este trabajo buscó mostrar si el cromosoma W de 4 especies del género *Ara* tenía igual al de otras aves neognatas estudiadas anteriormente, como se reporta por diversos autores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se muestrearon 32 animales en cautiverio, de procedencia desconocida, localizados en dos zoológicos y una finca ubicados en el departamento de Cundinamarca-Colombia.

Se obtuvo de cada sujeto experimental de 1,5 a 3 mL de sangre periférica con anticoagulante Liquemine Roche® recolectados de la vena basilica. La recolección de la muestra se hizo en condiciones asépticas para garantizar la esterilidad de la muestra. La toma de muestras se realizó con restricción física. Las muestras refrigeradas fueron transportadas al Laboratorio de Citogenética de la FMVZ de la Universidad Nacional, donde se procedió a realizar el cultivo de leucocitos siguiendo la técnica modificada de Gianoni.¹⁵

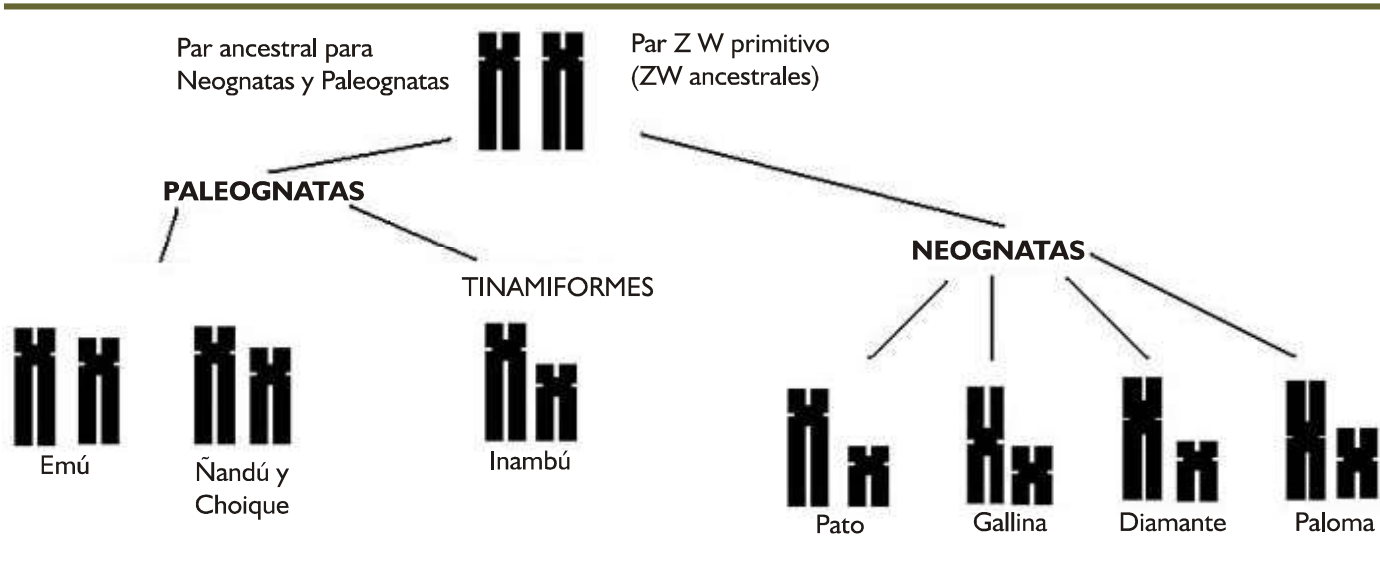


Figura 1. Principales diferencias entre los cromosomas sexuales de aves neognatas y paleognatas

Para el propósito de identificación de los cromosomas, se realizaron los siguientes protocolos de bandeado C, se ensayaron los procedimientos de Sumner (1972), Shoffner (1974) [citado por Gianonni *et al*, 1986], Popescu (1981) [citado por Gianonni *et al*, 1986] y el descrito por Gianonni, *et al* (1986).^{15, 24, 28}

Se realizó el análisis al microscopio y posterior registro fotográfico de las metafases analizadas. Luego se elaboraron los cariotipos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron primero metafases con tinción convencional en donde se demuestra la diferencia de tamaño entre los cromosomas sexuales de cada una de las espe-

cies (Figura 2: muestra una metafase con tinción convencional de un individuo hembra de la especie *Ara militaris*, nótese la diferencia de tamaño entre los dos cromosomas sexuales Z y W, identificándose el cromosoma W por ser de mucho menor tamaño que el Z). Las figuras 3a y 3b: muestran metafases con tinción CBG de individuos *Ara ararauna* y *Ara macao* machos, en ésta última figura se observa el cromosoma W dentro de un recuadro, se evidencian los bloques de heterocromatina constitutiva en todos los pares de macrocromosomas, siendo totalmente heterocromáticos los microcromosomas y el cromosoma W.

En este trabajo, los cromosomas de las cuatro especies del género *Ara*, mostraron bandas C satisfactorias si-

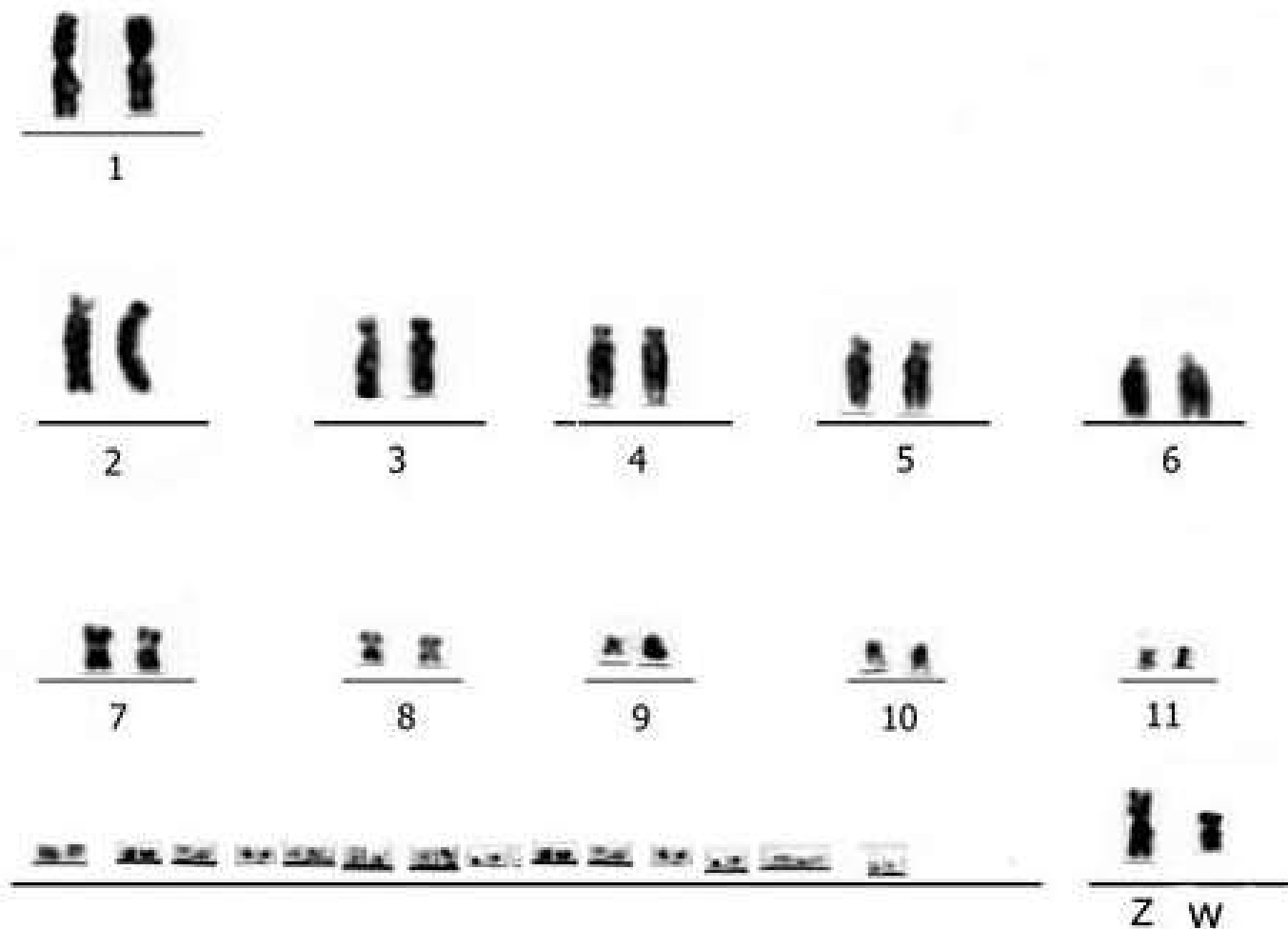


Figura 2. Metafase con tinción convencional de un individuo hembra de *Ara militaris*.

guiendo el procedimiento de Gianonni *et al.* (1986). De los resultados de este estudio un patrón de bandeo C es propuesto, indicando la localización de las regiones heterocromáticas en los macrocromosomas y microcromosomas de *Ara ararauna*, *Ara chloroptera*, *Ara macao* y *Ara militaris* (Figura 4).

Se observaron cantidades variables de heterocromatina

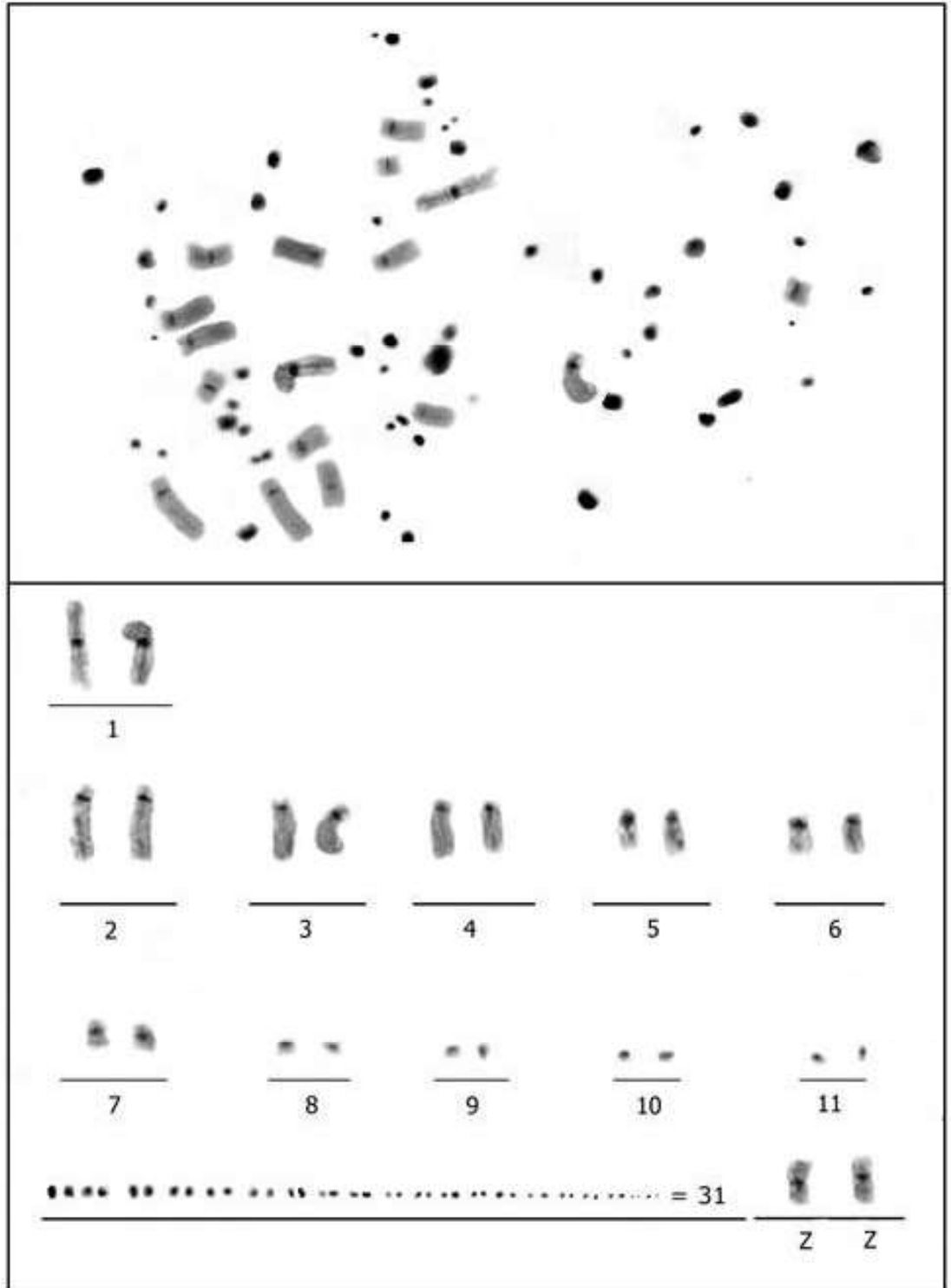


Figura 3a. Metafase de un individuo macho de *Ara ararauna*

a nivel de los microcromosomas en las cuatro especies analizadas.

Los cromosomas de todas las especies estudiadas muestran un bloque de heterocromatina constitutiva en

la región centromérica y en una pequeña porción de la región pericentromérica; no se evidenciaron bandas C intercalares, y el cromosoma W se observó uniformemente heterocromático en todas las metafases, el cro-

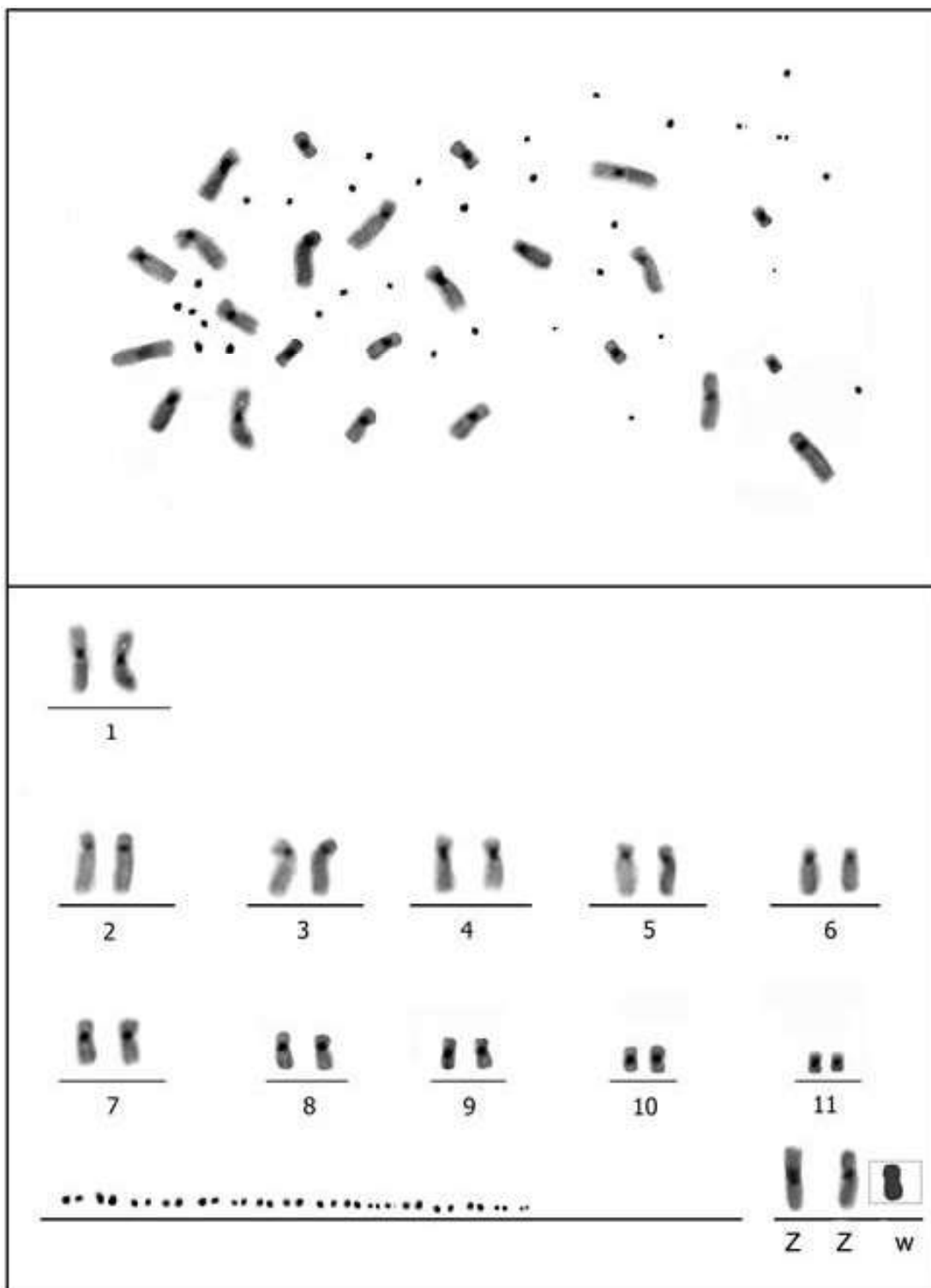


Figura 3b. Metafase de un individuo macho de *Ara macao*, en el recuadro se observa el cromosoma W.

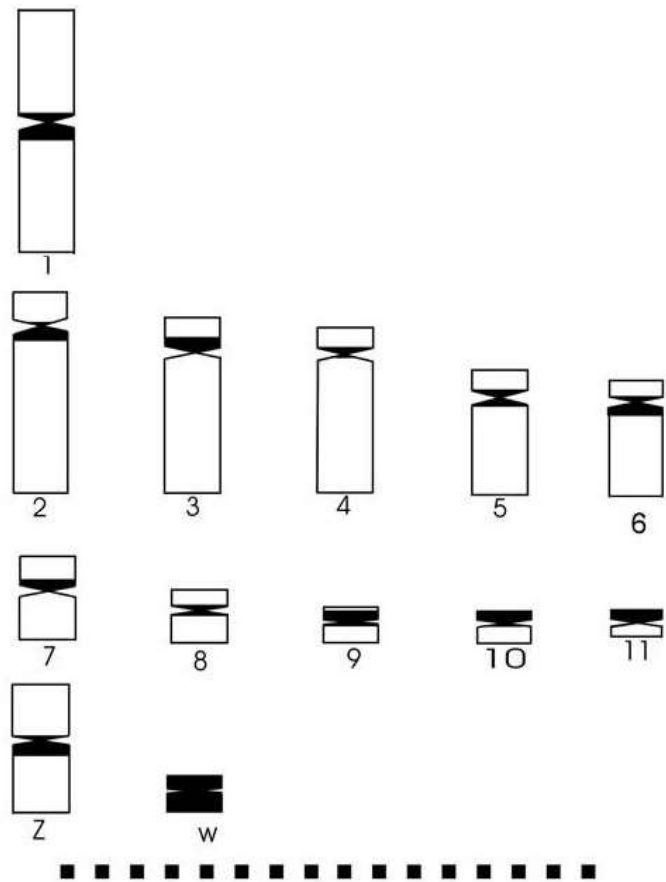


Figura 4. Ideograma propuesto para el patrón de bandas C en las cuatro especies estudiadas.

mosoma W totalmente heterocromático lo hace fácilmente identificable, permitiendo que esta técnica de bandeo se convierta en una herramienta útil para la identificación del sexo en estas aves carentes de dimorfismo fenotípico sexual (Figura 5).

BIBLIOGRAFIA

1. Ansari H A, Takagi N and Sasaki M. Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 47: 185-188.
2. Au W and Soukup SW. Identification of the W Chromosome in the bald eagle *Mammal Chrom Newsl* 1974; 15: 4-5.
3. CITES Convención. Internet www.wcmc.org.uk/CITES
4. Collar NJ, Juniper At. Dimensions and causes of the parrot conservation crisis, International council of bird preservation. Tech Publ 1991.

5. Comings DE y Mattoccia E. Studies of microchromosomes and a G-C rich DNA satellite in the quail. En: *Chromosoma*. 1970; 30: 202-214.
6. De-Boer LEM, Belterman RHR. Chromosome banding studies of the razor-billed curassow, *Crax mitu* (aves galliformes: *Cracidae*). En: *Genética*. 1981; 54: 225-232.
7. De-Boer LEM, R. Van Bockstaele. The somatic chromosomes of the Congo peafowl (*Afropavo congensis*) and their bearing on the species, affinities. *The Condor* 84. 1981.
8. De-Boer LEM. (1981). A review of avian karyology. *Genética* 1981 364-396.
9. De-Lucca EJ. Constitutive heterochromatin and the structural complexity of chromosomes in columbiformes and Psittaciformes (Aves). *Caryologia* 1983; 36: 373-384.
10. De-Lucca EJ. A comparative study of the chromosomes in 5 species of birds from the genus *Aratinga* (Psittaciformes Aves) *Cytologia* 1984; 49: 537-545.
11. De-Lucca EJ y Rocha GT. Citogenética de aves, Bol. Mus. Para Emilio Goeldi, ser. Zool. 1992; 8 (1).
12. De-Lucca EJ and De Marco DA. Chromosomal polymorphism in *Forpus xanthopterygius* (Psittaciformes: Aves). In: *Caryologia* 1983; 36(4): 355-361.
13. Drews C. Rescate de fauna en el neotrópico. EUNA Editorial 1 edición. 1999
14. Forshaw JM. Parrots of the world, third revised edition. Willoughby Australia, Lansdowne Editions. 1989.
15. Giannoni M L, Gianonni M A, Ferrari I. Citogenética aplicada a las Aves: Técnicas. Universidade de estadual Paulista UNESP (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias) 1986.
16. Gómez M, Polanco R, y Villa A. Uso sostenible y conservación de fauna silvestre en los países de la cuenca amazónica. Informe Nacional, Ministerio del Medio Ambiente. 1991
17. Mengden GA. Linear differentiation of the C-band pattern of the W chromosoma in snakes and birds. En *Chromosoma*. 1981; 83: 275-287.
18. Pigozzi MI y Solari AJ. Los cromosomas sexuales y la evolución de las aves. En: *Ciencia hoy*. 2000; 10(56): 22-34.
19. Pollock BJ and Fechheimer NS. Variable C-banding patterns and a proposed C-Band karyotype in *Gallus domesticus*. En: *Genética* 1981; 54: 273-279.
20. Raman R, Jacob M and Sharma T. Heterogeneity in distri-

- bution of constitutive heterochromatin in four species of birds. *Genética* 1978; 48: 61-65.
21. Rocha GT y De-Lucca EJ. Sexagem de aves. UNESP Instituto de Biociencias Dpto. De Genética. 1989.
 22. Rytman H, Tegelstrom H, Jansson H. G and C banding in four related *Larus* species (aves). En *Hereditas* 1979; 91: 143-146.
 23. Rytman H, and Tegelstrom H. G- banded karyotypes of three Galliformes species, Domestic Fowl (*Gallus domesticus*), Quail (*Coturnix coturnix japonica*), and Turkey (*Meleagris gallopavo*). En: 1981; *Hereditas* 94: 165-170.
 24. Shoffner RN. Chromosome of birds. The cell nucleus. 1974; 2: 223-261. Edi. Bush H. N.Y. Academic. [referenciado por Gianonni *et al*, 1986].
 25. Stephos K, y Arrighi FE. Heterochromatic nature of W chromosome in birds. En: *Exp. Cell Res.* 1971; 68: 228-231.
 26. Stock AD, Arrighi FE, Stephos K. Chromosome homology in birds: banding patterns of the chromosomes of the domestic chicken, ring necked dove, and domestic pigeon. *Cytogenetic Cell genet* 1974; 13: 410-418.
 27. Stock AD, Mengden GA. Chromosome banding pattern conservation in birds and nonhomology of chromosome banding patterns between birds, turtles, snakes and amphibians *chromosoma* 1975; 50: 69-77.
 28. Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. En: *Exp. Cell Res.* 1972 75: 304-306.
 29. Takagi N, Makino S. A revised study on the chromosomes of three species of birds caryologia. 1966; 19(4): 443-455.
 30. Valverde de Oliveira MD, Wilham J, Barezami CP. Chromosomes study in 6 brazilian birds. En: *Caryologia* 2001; 54 (3): 235-244.
 31. Wang N, Shoffner RN. Trypsin G and C banding for interchange analysis and sex identification in the chicken. En *Chromosoma* 1974; 47: 61-69.

Rehabilitación de Fauna Silvestre

Curso teórico práctico

23 y 24 de Agosto de 2005

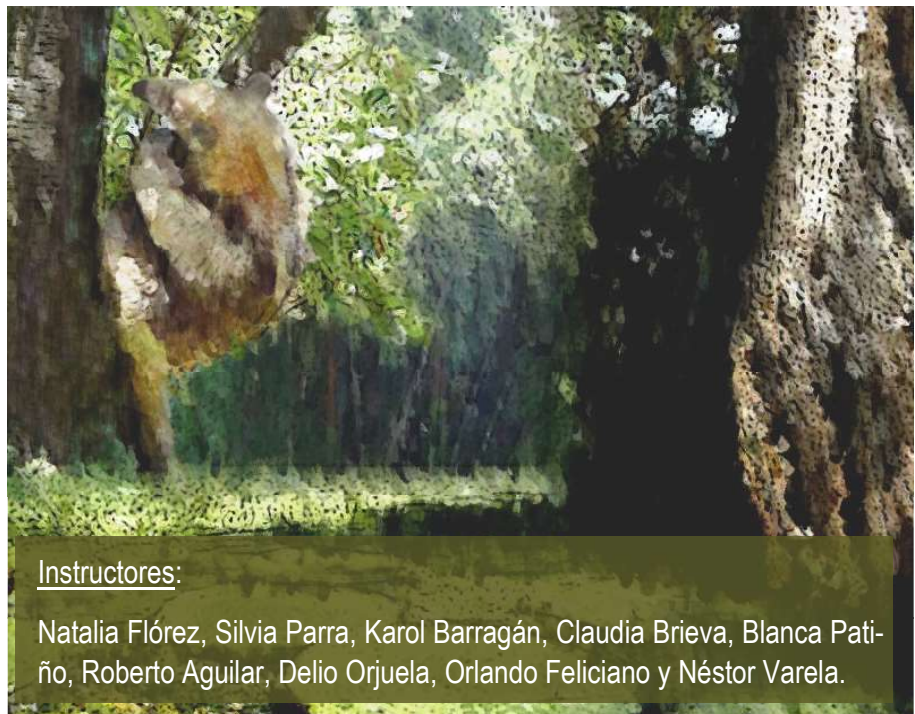
Lugar: Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS), Bogotá-Colombia.

Contáctenos para mayor información:

<http://www.veterinariosvs.org/>

info@veterinariosvs.org

Teléfono: 3165044 extensión 15395



Instructores:

Natalia Flórez, Silvia Parra, Karol Barragán, Claudia Brieve, Blanca Patiño, Roberto Aguilar, Delio Orjuela, Orlando Feliciano y Néstor Varela.