

---

## DETERMINACIÓN DE SEXO EN AVES MEDIANTE HERRAMIENTAS MOLECULARES

### Sex Determination In Birds By Molecular Tools

NUBIA E. MATTA CAMACHO<sup>1</sup>, Ph. D.; NATALY RAMÍREZ MARTÍN<sup>2</sup>,  
Bac.; BETTY C. ZÚÑIGA DÍAZ<sup>2</sup>, Bac.; VICTOR VERA<sup>3</sup>, Ph. D.

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad  
Nacional de Colombia. Sede Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup>Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá-Colombia.

<sup>3</sup>Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Sede  
Bogotá, Ciudad Universitaria, Bogotá-Colombia.

Presentado 5 de mayo de 2008, aceptado 20 de octubre de 2008, correcciones 10 de diciembre de 2008.

#### RESUMEN

La ausencia de dimorfismo sexual en los estadios juveniles y durante la edad adulta de gran cantidad de especies de aves, dificulta o imposibilita la determinación del sexo basados en el fenotipo. El empleo de marcadores moleculares para determinar el sexo de las aves es una herramienta útil debido a la exactitud y rapidez de los resultados y a su vez se constituye en un método que minimiza el estrés durante la toma de muestra, comparado con otras técnicas invasivas que pudieran afectar la salud o estabilidad biológica del animal. La determinación temprana del sexo en aves resulta de especial relevancia cuando se consideran programas de conservación *ex situ*, producción, explotación y estudios de ecología de poblaciones. Esta revisión presenta las metodologías usadas para determinar el sexo, haciendo especial énfasis en herramientas moleculares, presentando sus ventajas y limitaciones.

**Palabras clave:** dimorfismo sexual, aves, CHD, tipificación molecular cromosoma W, cromosoma Z.

#### ABSTRACT

The lack of sexual dimorphism in nestling, juvenile or adult birds of large number of avian species, makes it difficult or impossible sex determination based on phenotypic characteristics. To use molecular markers for bird sex determination is a rapid and safe procedure; moreover this methodology minimizes the stress during sampling, compared to other invasive techniques that could affect the health or biological stability of the animal. The early sex determination in birds is of particular importance when considering *ex situ* conservation programs, production, exploitation or population ecology studies. This review presents the methodologies used to sex determination, making emphasize on molecular tools, showing its advantages and limitations.

**Key words:** sexual dimorphism, birds, CHD, molecular typing, W chromosome, Z chromosome

## INTRODUCCIÓN

El dimorfismo sexual es definido como la diferencia de formas, coloración y tamaños entre machos y hembras de una misma especie. El conjunto de dichos caracteres es lo que permite distinguir las llamadas características sexuales primarias (genitales externos) y las características sexuales secundarias, las cuales no son estrictamente necesarias para la reproducción pero tienen alguna función durante la misma, ya que la expresión de caracteres como tamaño, fuerza y colorido son un conjunto de aspectos que juegan un papel fundamental al garantizar el éxito en los procesos de apareamiento; es así como el tamaño de los machos en determinadas especies es importante porque les permite competir con otros machos por el apareamiento con las hembras; el plumaje vistoso está asociado con la elección por parte de la hembra (Owens y Bennet, 1994). Este conjunto de parámetros son ampliamente controlados por genes ligados a los cromosomas sexuales; en el caso de las aves son los cromosomas ZW y en el caso de los mamíferos XY (Frayer y Wolpoff, 1985).

En las aves, los machos son homogaméticos (ZZ) y las hembras son heterogaméticas (ZW; Tone *et al.*, 1982; Saitoh *et al.*, 1991). Gran parte del cromosoma W (al igual que el Y) presenta señales típicas de un cromosoma sexual degenerado, debido a su bajo contenido de material genético codificante (menos de veinte genes), rico en secuencias satélites similares a las encontradas en la heterocromatina del centrómero, lo cual lo hace susceptible de cambios y mutaciones pues no está sujeta a una presión selectiva (Fridolfsson *et al.*, 1998). La presencia de gran cantidad de DNA no codificante es explicada por la acumulación de mutaciones deletéreas o presencia de elementos transponibles. Por su parte, el cromosoma Z (al igual que el X) es uno de los cromosomas más conservados pues aún mantiene el mismo grupo de genes codificantes, cerca de 350 genes (Mizuno *et al.*, 2002; Stiglec *et al.*, 2007).

En cuanto a los principales genes que juegan un papel importante en la determinación del sexo en las aves encontramos el gen DMRT1 y HINTW (Raymond *et al.*, 1999). El gen DMRT1 se encuentra ausente en W y en los embriones de las aves, se expresa solo en las gónadas y en los conductos de Müllerianos en donde la expresión es más alta en los machos que en las hembras. Entre tanto el gen HINTW se encuentra presente tanto en el cromosoma W y Z, pero la actividad dominante de este inhibe bioquímicamente la función de HINTZ, permitiendo que se exprese fuertemente en los embriones femeninos y de esta manera participa en una forma activa en el desarrollo de las gónadas, llevando a la diferenciación sexual (Pace y Brenner, 2003; Moriyama *et al.*, 2006).

Así mismo, recientes estudios han demostrado que los cromosomas sexuales actúan recíprocamente para regular la determinación del sexo, pues se ha logrado identificar una región de repeticiones en *tandem* metiladas ubicadas en el gen DMRT1 del cromosoma Z (MHM); dicha región presenta una hipermetilación en los machos y una hipometilación en las hembras lo que permite que esta región al ser transcrita produzca un RNA no codificante, silenciando de esta manera la expresión de este gen en las hembras, lo cual indica que el cromosoma W juega un papel regulador en la metilación del cromosoma Z (Teranishi *et al.*, 2001).

Sin embargo, además de los genes anteriormente mencionados se han realizado estudios de aquellas regiones que aún conservan algunas homologías ancestrales, provenientes de los cromosomas homólogos de los cuales se derivan los cromosomas sexuales. Dichas secuencias se encuentran ubicadas en la porción pseudoautosomal (secuencias que recombinan durante la meiosis) las cuales han logrado permanecer idénticas dentro de los distintos órdenes evolutivos de aves que existen actualmente en el mundo (Fridolfsson *et al.*, 1998; Griffiths y Phil, 2000).

La identificación del sexo resulta de mucha importancia en estudios de biología evolutiva, de ecología, identificación forense, de genética de poblaciones, de conservación, así como en la planeación de la reproducción de especies amenazadas o en claro peligro de extinción. El advenimiento de metodologías rápidas y específicas como las que hacen uso de herramientas moleculares basadas en el análisis de genes que se encuentren ubicados en los cromosomas sexuales y que hallan logrado permanecer conservados entre los distintos órdenes evolutivos de aves tales como CHD1 y ATP5a1, como resultado de la ausencia de recombinación entre estos (Fridolfsson *et al.*, 1998; Griffiths y Phil, 2000; García y Mindell, 2000; De Kloet y De Kloet, 2003) permitirían obtener resultados mucho más exactos y precisos en el momento de determinar el género al cual pertenece el ave analizada.

#### **METODOLOGÍAS DE SEXAJE BASADAS EN HERRAMIENTAS NO MOLECULARES**

La identificación del sexo se ha venido realizando por metodologías que incluyen la observación de comportamiento sexual, o presencia de parche de cría pero que solo son aplicables en época de apareamiento. Otras metodologías que se han utilizado son: el análisis morfométrico (Favero, 2001), el análisis citogenético, la citometría de flujo y técnicas quirúrgicas como laparoscopia y laparotomía (Richner, 1989; Cavallo *et al.*, 1997). Estas últimas permiten visualizar directamente las gónadas que determinan el sexo del ave; sin embargo, específicamente en la laparoscopia esta identificación puede ser difícil por el color de las gónadas o en las etapas tempranas de desarrollo del ave. Por otro lado, por ser técnicas quirúrgicas conllevan todos los riesgos propios de este tipo de procedimientos invasivos (Berthold, 1969; Bree y Kelch, 1999).

Entre las técnicas más empleadas encontramos el análisis de esteroides fecales, este método mide la proporción entre estrógenos/testosterona en las heces fecales de las aves; donde se espera encontrar proporciones más altas de estrógenos en aquellas muestras provenientes de las hembras. Para lograr un mayor grado de exactitud en los resultados obtenidos es necesario mantener las muestras en congelación desde el momento que se toman con el fin de garantizar la estabilidad de las hormonas, los resultados se ven afectados por la edad del animal y la época de cría (Swengel *et al.*, 1996; Miyaki *et al.*, 1998; Cerit y Avanus, 2007).

La citogenética es una técnica que permite identificar el sexo del ave mediante el análisis de los cromosomas. Esta metodología requiere de células provenientes de la pulpa de la pluma, las cuales sólo son disponibles después de su muda o en los polluelos o provenientes de sangre en cantidad suficiente para un cultivo celular de seis a ocho gotas de sangre que equivalen 0,4-0,5  $\mu$ l de sangre. El procedimiento implica cultivo de células, posterior cosecha y tratamientos de tinción y ordenamiento de los cromosomas (Stefos y Arrighi, 1971). Este es un procedimiento que requiere tiempo para

estandarización, las células que se manipulan para realizar el cultivo no son fáciles de conseguir y como todos los cultivos celulares son susceptibles de contaminación. Así mismo los distintos órdenes de aves poseen un cariotipo extenso y complejo, puesto que tienen entre 40 y 126 cromosomas, muchos de ellos del mismo tamaño y disposición del centrómero, algunas especies tienen microcromosomas y otras no tienen dimorfismo sexual cromosómico haciendo difícil su inspección y correcta identificación (Griffiths y Phil, 2000).

Otro método de reciente incursión es la citometría de flujo, donde se pasa las células marcadas con fluorocromos por una corriente angosta de fluido. Los fluorocromos son excitados por un rayo laser, los sensores ópticos detectan las señales generadas. Con esta metodología es posible obtener información sobre el tamaño, complejidad intracelular y marcadores de membrana de la población celular analizada. En cuanto al objetivo de la presente revisión esta técnica permite realizar una estimación exacta, rápida y cuantitativa acerca del DNA contenido en las miles de interfases celulares permitiendo la asignación de sexo, pues el contenido total de DNA del macho es mayor que el de la hembra, debido a que el tamaño del cromosoma Z es superior cuando comparado con el cromosoma W (Cavallo *et al.*, 1997). Es una técnica rápida, específica, usa como muestra sangre; sin embargo este equipo no es ampliamente disponible en el país y su uso requiere personal entrenado.

La mayoría de estos métodos son costosos, requieren de largos períodos de tiempo para obtener los resultados esperados, someten al animal a procesos de estrés y/o pueden poner en riesgo la capacidad reproductiva del ave (Richner, 1989; Cavallo *et al.*, 1997). Es por eso que la implementación de técnicas moleculares se han convertido en alternativas atractivas debido a la exactitud y rapidez de los resultados; y a su vez representa una de las pocas técnicas que no someten al animal a situaciones estresantes de toma de muestra, que puedan perjudicar su salud o estabilidad biológica, pues requieren de poca muestra de sangre (gotas-microlitros) incluso puede realizarse a partir de plumas arrancadas o caídas (Fridolfsson y Ellegren, 1999). Dichas técnicas utilizan como molécula básica el DNA de un individuo; que se encuentra en todas las células del cuerpo (ej. sangre, pelo, cañón de las plumas) y es conservado durante toda la vida del animal y así mismo este puede ser almacenado durante largos períodos de tiempo *in vitro*. Se han descrito diversas aproximaciones moleculares para la identificación del sexo en aves; ellas incluyen polimorfismos de DNA amplificados al azar (Lessels y Matemam, 1998), fragmentos amplificados de longitud polimórfica (Griffiths y Orr, 1999), minisatélites (Miyaki *et al.*, 1998), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (Griffiths y Tiwari, 1995; Griffiths *et al.*, 1996).

#### **METODOLOGÍAS QUE HACEN USO DE LA HIBRIDACIÓN DEL DNA**

**Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).** Los RFLP se definen como el polimorfismo observado en la longitud de los fragmentos obtenidos por el corte de la doble cadena de DNA. Esta metodología brinda la posibilidad de comparar los perfiles de bandas generados después de la digestión por enzimas de restricción de las moléculas de DNA de individuos diferentes. Las bandas son generadas por la hibridación de fragmentos de DNA con secuencias homólogas de DNA radiomar-

cadas. Los RFLPs permiten detectar las diferencias de sexo porque los cromosomas sexuales en este caso tienen patrones de asociación con la sonda radiactiva. Dentro de las limitaciones está su difícil automatización y la manipulación de material radiactivo para su visualización (Ferrerira y Grattapaglia, 1998). Esta metodología ha sido usada con éxito por Dvorák *et al.*, 1992, quién logró identificar la sonda pMg1 que detecta RFLPs ligados al sexo en Gallináceas y otras especies de aves.

**Minisatélites.** Jeffreys *et al.*, 1985, describen a los minisatélites como regiones no codificantes del genoma de aproximadamente 100 pb que se encuentran organizadas en repeticiones en *tandem*. Generalmente estos sitios presentan un polimorfismo debido a la variación en el número de repeticiones; a esto se le conoce como número variable de repeticiones en *tandem* (VNTR). Estos autores describieron y desarrollaron las sondas de DNA que son capaces de descubrir números grandes de minisatélites y la hipervariabilidad de los sitios, por medio de la hibridación de los fragmentos de DNA digeridos y de su posterior electroforesis, donde se visualiza un patrón de bandas que es único para cada individuo.

Miyaki *et al.*, 1997, por medio de fragmentos de DNA digeridos con las enzimas de restricción *Mbo*I y *Hae*III (para *Amazona* y otros géneros, respectivamente), identificaron bandas específicas de sexo en hembras del orden Psittaciformes. No fue posible determinar el sexo de todas las especies entre ellas loros de “cola corta” (géneros *Amazona*, *Pionus*, *Pionites* y *Pionopsitta*), así como de *Deroptyus* y *Trichilaria* (loros de “cola larga”). Fue eficaz para sexar aves pertenecientes al grupo de los loros de “cola larga” de los géneros *Ara*, *Anodorhynchus* y *Cyanopsitta* (guacamayas) y *Aratinga* y *Nandayus* (loros).

**Microsatélites.** Consisten en secuencias cortas de 1 a 4 nucleótidos repetidos entre 10 y 50 veces a lo largo del genoma rodeados por regiones altamente conservadas (Kuhl y Caskey, 1993). Los microsatélites son vulnerables a errores en la replicación, a causa de su estructura repetitiva como consecuencia de una deficiencia postreplicativa durante la reparación de apareamientos erróneos (Toledo y Cruz, 2005).

Yeung *et al.*, 2004, desarrollaron siete marcadores polimórficos de microsatélites enriquecidos con la repetición nucleotídica GATA. Dos de los alelos pueden ser usados para la identificación del sexo de aves, pero en este, se observan a los machos como heterocigotos y a las hembras como homocigotas según el número de bandas. Por otro lado, Nesje y Roed, 2000, describieron dos marcadores de microsatélite construidos de una hembra de halcón peregrino (*Falco peregrinus*). Los fragmentos NVH fp49 y NVH fp102 se encuentran exclusivamente en el cromosoma W, lo cual permite identificar a las hembras de halcones fácilmente.

**METODOLOGÍAS QUE HACEN USO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**  
Esta técnica hace uso de una característica fundamental del DNA que es la complementariedad de sus bases nucleotídicas. Utiliza una enzima que realiza la copia de la secuencia de interés que se conoce como *Taq* Polimerasa, también unas pequeñas secuencias de nucleótidos denominadas *primers* o cebadores y condiciones de temperatura y cofactores que aseguran que la hebra de DNA se abra, los *primers* se unan, la *Taq* polimerasa copie; este proceso se repite cientos de veces; lo que permite que a partir de poca cantidad de DNA se obtengan miles de copias del mismo para realizar análisis múltiples.

**Polimorfismo de DNA amplificado al azar (RAPD).** Técnica que emplea *primers* cortos (10 nucleótidos) de secuencia arbitraria, que permiten realizar la amplificación sin la necesidad de conocer las secuencias blanco de nucleótidos. Es una técnica simple y de bajo costo (Welsh y McClelland, 1990). El empleo de esta técnica ha permitido generar huellas genéticas reproducibles que facilitan la identificación del sexo al cual pertenecen cierto tipo de aves tales como: *Parus major* (carbonero común), *Haematopus ostralegus* (Ostrero común), *Jacana spinosa* (Gallito de agua Mejicano), *Merops apiaster* (Abejaruco común) entre otros (Ferrerira y Grattapaglia, 1998; Lessells y Mateman, 1998). Así mismo Chean-Ping *et al.*, 2007, lograron sintetizar un juego de *primers* que le permitió identificar secuencias específicas de 777pb en *Streptopelia orientalis* (tortola oriental), secuencias que se encuentran conservadas en otras especies de como *Streptopelia chinensis* (Tortola china) y *Columba livia* (Paloma bravia), a su vez, esta técnica fue empleada para identificar nuevos marcadores sexuales en las aves, para lo cual se emplearon 160 *primers* construidos a partir de la técnica RAPD-PCR, lo cual permitió identificar una banda de 902 pb propia de las hembras y ausente en los machos (Chean-Ping *et al.*, 2007). Esto indica que los marcadores RAPD podrían emplearse en la identificación del sexo, ya que si el marcador seleccionado está en el cromosoma W, él sería amplificado solamente en las hembras, proporcionando así un marcador específico para este género (Griffiths y Tiwari, 1995). Sin embargo, esta técnica tiene baja reproducibilidad debido a las condiciones de reacción y/o competencia entre el DNA de diferentes fragmentos, que hace que aparezcan bandas inespecíficas más débiles (Ellegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1996); la mayoría de los *primers* empleados son generalmente específicos, lo que lleva a gran cantidad de tiempo y costos en los *primers* a ser probados para una nueva especie; además, mutaciones en el sitio de unión del *primer* puede ocasionar la aparición de alelos nulos llevando a errores en la identificación (Lessells y Mateman, 1998).

**Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP).** Esta metodología es una combinación de las técnicas RFLP y PCR; tiene la ventaja de ser reproducible, analiza gran cantidad de *loci* detectando polimorfismos a partir de poca muestra. Consta de cuatro etapas: primero se somete el DNA a una digestión con dos enzimas de restricción; luego se incorporan adaptadores específicos a los extremos de los fragmentos genómicos generados por la digestión enzimática; en la tercera etapa, una fracción de los fragmentos generados es amplificado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando *primers* específicamente diseñados para reconocer las secuencias en los adaptadores y, finalmente, los fragmentos generados son visualizados en geles de agarosa o poliacrilamida.

Los AFLPs pueden ser usados para generar suficientes marcadores polimórficos que permitan detectar pequeñas diferencias individuales a nivel de huella genética, útil para identificación de individuos, estimación de análisis de parentesco y en la determinación del sexo en algunas aves como *Struthio camelus* (Avestruz) y *Phalacrocorax aristotelis* (Carmoran moñudo); se han determinado aproximadamente 120 marcadores, de los cuales dos se encuentran solamente en el cromosoma W del *Phalacrocorax aristotelis* y tres en el *Struthio camelus*, permitiendo su clasificación (Griffiths y Orr, 1999). A su vez reconoce la presencia o ausencia de fragmentos de DNA en un *locus* dado, pero tiene la desventaja de ser un marcador dominante (Ferrerira y Grattapaglia, 1998).

Este compendio de técnicas moleculares han resultado útiles para ciertas especies de aves, pero algunas de las secuencias que son reconocidas por un determinado juego de *primers* o por una metodología no son reproducibles en todas las especies, debido a que el DNA no codificante que se encuentran en el cromosoma W evoluciona y cambia de secuencia rápidamente (Lessells y Mateman, 1998; Griffiths y Orr, 1999). Por tal motivo, se buscó la identificación de una secuencia de DNA que se encontrara ligada a los cromosoma Z y W, que fuera bastante conservada entre especies, en la mayoría de los casos éstas son secuencias exónicas dentro de los genes que finalmente se traducen a proteínas y que cumplen funciones específicas en el organismo. Las otras secuencias dentro de los genes que no hacen parte de la proteína final, se denominan intrones; debido a que estas secuencias no codifican para aminoácidos es más probable que tengan cambios en su secuencia de nucleótidos que aquellas que codifican, esto hace que al analizar la totalidad de secuencia de nucleótidos entre diferentes especies de aves, podamos observar diferencias; este fenómeno es conocido como variabilidad intrónica (Ellegren y Fridolfsson, 1997).

**Diferencias en el tamaño del intrón por la amplificación del Gen CHD.** La prueba de sexaje molecular se basa en el análisis del gen cromo-helicase-región de unión al DNA (CHD), el cual hasta el momento ha sido uno de los pocos genes ligados tanto al cromosoma Z como al W (Griffiths y Holland, 1990; Griffiths y Tiwari, 1995; Kahn *et al.*, 1998). Este gen se encuentra muy conservado entre los diferentes órdenes evolutivos tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos y se ha demostrado que puede ser usado para la identificación del sexo en aves, con unas pocas excepciones como las ratites (avestruces; Griffiths *et al.*, 1998; Fridolfsson y Ellegren, 2000). Las tipificaciones basadas en este gen pueden darse por el corte diferencial con enzimas de restricción del producto amplificado (Griffiths *et al.*, 1998), polimorfismo conformacional de banda única (SSCP) (Griffiths *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2004), o diferencias en el tamaño del intrón amplificado (Kuhl y Caskey, 1993; Miyaki *et al.*, 1997; Millar *et al.*, 2000; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002a).

Para la identificación y posterior amplificación del gen, se han empleado una serie de *primers* que se caracterizan por poseer una secuencia nucleotídica capaz de reconocer regiones exónicas conservadas, permitiendo de esta manera que se lleve a cabo la amplificación de un intrón, que es menos conservado (Griffiths *et al.*, 1998; Kahn *et al.*, 1998). Esto permite observar diferencias de tamaño en los productos amplificados del gen CHD en los cromosomas W y Z, debido a que presentan longitudes diferentes en los intrones que son amplificados para la determinación del sexo (Fridolfsson y Ellegren, 1999). La copia de W siempre es más grande, haciendo pensar que en algunos casos ha ocurrido una delección en el cromosoma Z o una inserción en el cromosoma W (Kahn *et al.*, 1998). Por tal motivo, es factible detectar un producto de amplificación del fragmento del gen CHD representado por una banda única por electroforesis en el macho, ya que este es homogamético (ZZ) y los dos productos de amplificación provenientes de cada uno de estos cromosomas presentarán igual peso molecular; mientras que en las hembras se obtienen dos bandas de distinto tamaño correspondientes a los productos de las amplificaciones de los genes CHD-Z y CHD-W, lo que permite la asignación inequívoca de sexo en una muestra determinada (Fig. 1).

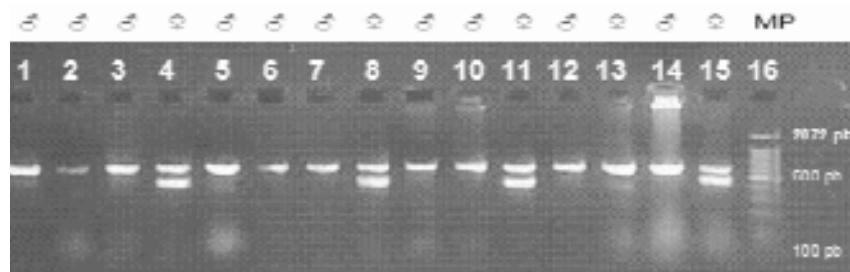


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa para la identificación de sexo en aves, evaluando la diferencia del tamaño del intrón del gen CHDW y CHDZ, mediante el uso de primers 2550F/2718R. Los machos se identifican por la presencia una sola banda proveniente del producto de amplificación de los cromosomas Z, mientras que las hembras muestran dos bandas correspondientes a los cromosomas W y Z (Zúñiga y Ramírez 2008).

Para la amplificación de dicha secuencia se han empleado con éxito los *primers* P2/P8 descritos por Griffiths *et al.*, 1998. Posteriormente Fridolfsson y Ellegren, 1999, publicaron otros *primers* (2550F/2718R) y otras condiciones de PCR que aseguraban la amplificación de ciertas especies de aves que no habían podido ser identificadas previamente. Con los *primers* 2550F/2718R se obtienen diferencias en un rango entre 150 a 250 pb; mientras que las diferencias en las secuencias obtenidas con los *primers* P2/P8 oscilan entre 10 y 80 pb (Fridolfsson y Ellegren, 1999; Jensen *et al.*, 2003). Esta pequeña diferencia de tamaño hace que estos dos productos sean fácilmente identificables por electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida. Este es un tipo de metodología simple, rápida comparado con otras técnicas moleculares y a su vez requiere cantidades muy pequeñas de DNA que pueden obtenerse de gotas de sangre o incluso de una pluma.

#### VARIANTES DE LA METODOLOGÍA DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN CHD

A pesar de que la metodología anteriormente expuesta es aplicable para un amplio rango de taxa de aves, existen dificultades para la asignación del sexo en aquellas que pertenecen a las familias Anatidae, Gruidae, Scolopacidae, Falconidae y Accipiteridae. Debido a que los productos de amplificación obtenidos del gen CHD-W y CHD-Z son muy similares, pues tan solo existe una diferencia de 2pb, que hace difícil identificar los productos obtenidos de la PCR (Ito *et al.*, 2003), en cualquiera de los geles mencionados. De esta manera tanto hembras como machos aparecen con una banda. Por tal motivo, se han establecido nuevos métodos que tienen como base la PCR, los cuales permitan realizar una determinación adecuada del sexo en las aves; uno de ellos es el PCR-RFLP.

**PCR-RFLP.** En este método el producto de amplificación del gen CHD es digerido con las enzimas de restricción Ddel o Hae III. El sitio Ddel es conservado en 14 especies de nueve géneros diferentes como *Gallus*, *Cyanopsitta*, *Ara*, *Amazona*, *Aratinga*, *Psittacus*, *Cyanoliceus* y *Rynchopsitta* (Griffiths y Tiwari, 1995; Griffiths *et al.*, 1996; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002a). Ejemplos de identificación eficiente de sexo con el corte con la enzima HaeIII incluyen miembros de la familia Accipitridae, donde los dos productos amplificados de CHD-Z como CHD-W son del mismo tamaño. En este caso, el corte por la enzima de restricción al producto amplificado, es selectivo para CHD-

Z pero no para W; de esta manera las hembras aparecerían con tres bandas y los machos con dos (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002b; Sacchi *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2007). Sin embargo, esta metodología tiene la limitación de una secuencia específica para que el corte con la enzima de restricción ocurra, cuando esta ha mutado no ocurre tal reconocimiento lo cual dificultaría la diferenciación sexual (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2002b).

**Sistema de mutación refractaria a la amplificación (ARMS) o PCR alelo específico (ASPCR).** Esta técnica puede amplificar solamente alelos específicos usando un *primer* 3' terminal desigual, el cual únicamente se une al alelo específico (Newton *et al.*, 1989; Uguzzoli y Wallace, 1991; Ito *et al.*, 2003), permitiendo así, identificar productos de mutaciones puntuales. Esta novedosa alternativa trae consigo varias ventajas: primero, requiere únicamente PCR, la cual es fácil y rápida de realizar, segundo, si no hay una enzima de restricción que reconozca el sitio, esta puede distinguir entre dos copias homologas (Ito *et al.*, 2003). La utilización oportuna de los ARMS ha permitido determinar el sexo en miembros de la familia Falconidae y Accipitidae, especialmente en especies que no pueden ser sexadas por los métodos basados en el polimorfismo de la longitud intrónica; los ARMS han logrado detectar puntos de mutación existentes entre CHDW y CHDZ (Ito *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2007).

#### **FAMILIA DE GENES CHD**

El gen CHD fue inicialmente aislado en ratones, posteriores hallazgos encontraron que es un gen altamente conservado encontrado desde levaduras hasta humanos. En la actualidad, se hace referencia a la familia de genes CHD que codifican para proteínas que comparten secuencias y dominios funcionales asociados con la regulación de la cromatina, estructura y transcripción del gen (Woodage *et al.*, 1997).

Las proteínas codificadas por esta familia de genes tienen tres dominios a los cuales deben su nombre: proteína Cromohelicasa/ATPasa de unión al DNA (*Cromo-Helicase/ATPase DNA binding proteín*: Fig. 2). El cromodominio, tiene una secuencia de aminoácidos similar a las proteínas HP1 y Policom que son proteínas involucradas en la represión génica, probablemente asociado a la condensación de la cromatina, aunque este mecanismo aún no es muy claro (Singh *et al.*, 1991). El segundo dominio Helicasa/ATPasa es similar a las proteínas SNF2 del humano, que se han demostrado activan la transcripción por descondensación de la cromatina (Sudarsanam y Winston, 2000). El tercer motivo de unión al DNA se une selectivamente a secuencias ricas en AT, vía interacción con el surco menor del DNA.

La identificación de la estructura de las proteínas miembros de la familia CHD fue sorprendente, pues en una sola proteína se conjugan funciones aparentemente contrarias y que habían sido descritas para proteínas separadas. Aunque no existe evidencia definitiva de los mecanismos de acción de los genes CHD y sus productos, Woodage *et al.*, 1997, proponen un modelo general en el cual ellas funcionan como reguladores negativos de la expresión génica, modificando la cromatina activa transcripcionalmente a una forma de heterocromatina, limitando así, el acceso del aparato transcripcional al DNA del cromosoma; refieren además que las funciones de estas proteínas, pueden darse por la formación de complejos con otras proteínas con afinidad por el ADN y la cromatina, lo que permitiría una variedad en los lugares de unión. El gen CHD encontrado



Figura 2. Cromo-dominios presentes en la estructura de la proteína CHD. Modificado de Woodage *et al.*, 1997.

en aves, por ser altamente conservado y además estar ubicado en cromosomas sexuales es un blanco casi universal para la identificación de sexo en aves (Ellegren, 1996).

#### LIMITACIONES

Los *primers* P2/P8 tienen la desventaja de que el producto de PCR del alelo del gen CHD-Z es menor que el de W y puede amplificarse de manera preferencial. Esto puede llevar a que las hembras sean confundidas como machos, sobre todo cuando la amplificación es débil. Además, en algunas especies la diferencia en el tamaño de los intrones amplificados por este juego de *primers* es muy pequeña (Griffiths *et al.*, 1998), por lo tanto se recomienda utilizar geles de poliacrilamida y no de agarosa para separar mejor las bandas de W y Z, ya que la poliacrilamida proporciona una mejor resolución. Por ejemplo, en las alcitas (*Aethia* spp. orden Charadriiformes) los fragmentos amplificados no pueden ser distinguidos en geles de agarosa. Por otra parte, la asignación del sexo por los *primers* P2/P8 puede ser difícil por el polimorfismo del gen CHD-Z (Dawson *et al.*, 2001).

Fridolfsson y Ellegren, 1999, encontraron que usando los *primers* 2550F/2718R en aves como la barnacla clariblanca, el esmerezón y el correlimos común (*Branta leucopsis*, *Falco columbarius* y *Calidris alpina*, respectivamente) el amplificado del gen CHD-W era menor en tamaño que el de Z, visualizándose una sola banda de amplificación en machos y hembras debido a que CHD-W se amplifica de manera preferencial.

#### CONCLUSIONES

La utilización de metodologías basadas en la PCR y en el gen CHD facilitan la identificación inequívoca del sexo en aves, es una metodología útil para tipificar el sexo en especies pertenecientes a distintos órdenes con escaso o nulo dimorfismo sexual, de aplicabilidad para reconocer la proporción de sexos de una población cautiva y lograr establecer el número correspondiente a los pares de cría potenciales, convirtiéndose de esta manera en una ayuda en la implementación de programas de reproducción en los zoológicos o en especies amenazadas, en las que se planea implementar programas de conservación *ex situ* que implica la determinación inequívoca de sexo. Por otro lado la aplicación de estas metodologías resulta una herramienta muy útil para productores, explotaciones o estudios de heredabilidad de rasgos de importancia económica. Apoya sin duda la obtención de información para estudios de comportamiento, ecología y estructura de poblaciones de aves silvestres. Las metodologías que hacen uso del DNA son herramientas valiosas por su rapidez, sensibilidad y la posibilidad de toma de muestras como plumas, uñas o simples gotas de sangre que minimizan el dolor y el estrés en los procedimientos de toma de muestra.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar sus agradecimientos a la Dra. Diana Sarmiento en la Asociación Colombiana de parques Zoológicos y Acuarios (ACOPAZOA), a la Dra. Claudia Brieva en la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Fauna Silvestre (URRAS), en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, al Dr. Gary Styles en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, por la donación y consecución de muestras de aves de museo. Al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, por el apoyo logístico y financiero.

Este proyecto fue financiado por la División de Investigación Bogotá (DIB), Universidad Nacional de Colombia. Proyecto N.º 7038.

## BIBLIOGRAFÍA

- BERMÚDEZ-HUMARAN L, GARCÍA A, LEAL C, RIOJAS V, JARAMILLO G, MONTES R. Molecular sexing of monomorphic endangered Ara birds. *J Exp Zoo.* 2002a;292:677-680.
- BERMÚDEZ-HUMARAN L, CHAVEZ P, GUZMAN A, LEAL C, MONTES R. Loss of Restriction Site Ddel, used for Avian Molecular Sexing, in *Oreophasis derbianus*. *Reprod Dom Anim.* 2002b;37:321-323.
- BERTHOLD P. Die Laparotomie bei Voegeln. *Der Zool. Garten.* 1969;37:271-279.
- BREE H, KELCH G. Cirugía de mínima invasión en pequeños animales. España: Editorial ACRIBIA S.A.; 1999.
- CAVALLO D, DE VITAE R, ELEUTERI P. Sex identification in the egyptian vulture by flow cytometry and cytogenetics. *The Condor.* 1997;99:829-32.
- CERIT H, AVANUS K. Sex identification in avian species using DNA typing methods. *Worlds Poult Sci J.* 2007;63:91-99.
- CHEAN-PING W, YAN-MING H, REAN-TSZ W, KUO-TAI Y, MU-CHIOU H. A novel sex-specific DNA marker in Columbidae birds. *Theriogenology.* 2007;67:328-333.
- DAWSON D, DARBY S, HUNTER F, KRUPA A, JONES I, BURKE T. A critique of avian CHD-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. *Mol Ecol Notes.* 2001;1:201-204.
- De KLOET RS, De KLOET SR. Evolution of the spindlin gene in birds independent cessation of the recombination of sex chromosomes at the spindlin locus in neognathous birds and tinamous, a palaeognathous avian family. *Genética.* 2003;119:333-342.
- DVORÁK J, HALVERSON J, GULICK P. cDNA cloning of a Z- and W-linked gene in Gallinaceous birds. *J Hered.* 1992;83:22-25.
- ELLEGREN H. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc Biol Sci.* 1996;263:1635-1641.
- ELLEGREN H, FRIDOLFSSON K. Male-driven evolution of DNA sequences in birds. *Nat Genet.* 1997;17:182-184.
- FAVERO M. Características morfológicas y dimorfismo sexual en la paloma antártica (*Chionis alba*). *Ornitol Neotrop.* 2001;2:173-179.

- FERRERIRA M, GRATTPAGLIA D. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1ed. Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN. 1998.
- FAYER D, WOLPOFF M. Sexual Dimorphism. *Annu Rev Anthropol.* 1985;14:429-473.
- FRIDOLFSSON A, CHENG H, COPELAND N, JENKINS N, RAUDSEPP H, WOODAGE T, et al. Evolution of the Avian Sex Chromosomes from an Ancestral Pair of Autosomes. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:8147-8152.
- FRIDOLFSSON A, ELLEGREN H. A simple and universal method for molecular sexing of non -ratite birds. *J Avian Biol.* 1999;30:116-121.
- FRIDOLFSSON A, ELLEGREN H. Molecular evolution of the avian CHD1 genes on the Z and W sex chromosome. *Genetics.* 2000;155:1903-1912.
- GARCÍA J, MINDELL D. Rooting a phylogeny with homologous genes on opposite sex chromosomes (gametologs): a case study using avian CHD. *Mol Biol Evol.* 2000;17:1826-1832.
- GRIFFITHS R, HOLLAND. A novel avian W chromosome DNA repeat sequence in the lesser black -nacked gull (*Larus fuscus*). *Chromosome.* 1990;99:243-250.
- GRIFFITHS R, TIWARI B. Sex of the last wild Spix.s macaw. *Nature.* 1995;375:454.
- GRIFFITHS R, DAAN S, DIJKSTRA C. Sex identification in birds using two CHD genes. *Biol Sci.* 1996;263:1251-1255.
- GRIFFITHS R, DOUBLE M, ORR K, DAWSON R. Short communication: A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol.* 1998;7:1071-1075.
- GRIFFITHS R, ORR K. The use of AFLP's to identify a sex-linked marker. *Mol Ecol.* 1999;8:671-674.
- GRIFFITHS R, PHIL D. Sex Identification in Birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine.* 2000;9:14-26.
- JENSEN T, PERNASETTI F, DURRANT B. Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers. *Zoo Biol.* 2003;22:561-571.
- JEFFREYS A, WILSON V, THEIN L. Hypervariable minisatellite region in human DNA. *Nature.* 1985;314:67-73.
- ITO H, SUDO-YAMAJI A, ABE M, MURASE T, TSUBOTA T. Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes. *Zoologl Sci.* 2003;20:339-344.
- KUHL D, CASKEY C. Trinucleotide repeats and genome variation. *Curr Opin Genet Dev.* 1993;3:404-407.
- LESSELLS C, MATEMAN A. Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol Ecol.* 1998;7:187-195.
- MILLAR C, TAYLOR G, MOORE P, HALVERSON J, LAMBERT D. A novel restriction fragment length polymorphism for petrels or tube-nosed seabirds. *Mol Ecol.* 2000; 9:1915-1917.
- MIYAKI C, DUARTE B, CAPARROZ R, NUNES A, WAJNTAL A. Sex identification of South American parrots (Psittacidae, aves) using the human minisatellite probe 33.15. *Auk.* 1997;114:516-520.
- MIYAKI C, GRIFFITHS R, ORR K, NAHUM L, PEREIRA S, WAJNTAL A. Sex

Identification of Parrots, Toucans, and Curassows by PCR: Perspectives for Wild and Captive Population Studies. *Zoo Biol.* 1998;17:415-423.

MORIYAMA S, OGIHARA J, KATO J, Hori T, MIZUNO S. PKCI-W forms a heterodimer with PKCI-Z and inhibits the biological activities of PKCI-Z *in vitro*, supporting the predicted role of PCKI-W in sex determination in birds. *J Biochem.* 2006;139:91-97.

MIZUNO S, KUNITA R, NAKABAYASHI O, KURODA Y. Z and W chromosomes of chickens: studies on their gene functions in sex determination and sex differentiation. *Cytogenet Genome Res.* 2002;99:236-244.

NESJE M, ROED K. Brief report. Sex identification in falcons using microsatellite DNA markers. *Hereditas.* 2000;132:261-263.

NEWTON C, GRAHAM A, HEPTINSTALL L, POWEL S, SUMMERS C, *et al.* Analysis of any point mutation in AND. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleotid Acids Res.* 1989;17:2503-2516.

OWENS F, BENNETT P. Mortality Costs of Parental Care and Sexual Dimorphism in Birds. *Proc Biol Sci.* 1994;257:1-8.

PACE H, BRENNER C. Feminizing chicks: a model for avian sex determination based on titration of Hint enzyme activity and the predicted structure of an Asw-Hint heterodimer. *Genome Biol.* 2003;4:R18.

RAYMOND C, PARKER E, KETTLEWELL J, BROWN L, PAGE D, KUSZ K, *et al.* A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet.* 1999;8:989-996.

REDDY A, PRAKASH V, SHIVAJI S. A rapid, non-invasive, PCR-based method for identification of sex of the endangered Old World vultures (white-backed and long-billed vultures) - Implications for captive breeding programmes. *Curr Sci.* 2007;92:659-662.

RICHNER H. Avian laparoscopy as a field technique for sexing birds and an assessment of its effects on wild birds. *J Field Ornithol.* 1989;60:137-142.

SACCHI P, SOGLIA D, MAIONE S, MENEGUZ G, CAMPORA M, RASERO R. A non-invasive test for sex identification in Short-toed Eagle (*Circaetus gallicus*). *Mol Cell Probes.* 2004;18:193-196.

SAITO H, SAITO H, OHTOMO K, MIZUNO S. Occupancy of the majority of DNA in the chicken W chromosome by bent repetitive DNA sequences. *Chromosoma.* 1991;101:32-40.

SINGH P, MILLER J, PEARCE J, KOTHARY R, BURTON R, *et al.* A sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:789-794.

STEFOS K, ARRIGUI F. Heterochromatic nature of W chromosomes in birds. *Exp Cell Res.* 1971;68:228-231.

STIGLE C, EZAZ T, GRAVES JAM. Reassignment of chicken W chromosome sequences to the Z chromosome by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Cytogenet Genome Res.* 2007;116:132-134.

SUDARSANAM P, WINSTON F. The Swi/Snf family: Nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet.* 2000;16:345-351.

SWENGEL S, ELLIS D, GEE G, MIRANDE C. Special techniques, C: Sex determination In: Cranes: Their Biology, Husbandry, and Conservation. Eds.;

National Biological Service/International Crane Foundation: United States of America; 1996. p. 23-231.

TERANISHI M, SHIMADA Y, HORI T, NAKABAYASHI O, KIKUCHI T, MACLEOD T, et al. Transcripts of the MHM region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the DMRT1 locus. *Chromosome Res.* 2001;9:147-165.

TOLEDO D, CRUZ D. La inestabilidad en microsatélites: algunos aspectos de su relación con el cáncer colorrectal hereditario no-polipoide. *Rev Cubana Invest Biomed* [serial online] 2005 Abr-Jun; 24. Disponible en: URL: [http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002005000200008&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002005000200008&lng=es&nrm=iso).

TONE M, NAKANO N, TAKAO E, NARISAWA S, MIZUNO S. Demonstration of W chromosome specific repetitive DNA sequences in the domestic fowl *Gallus g. domesticus*. *Chromosoma*. 1982;86:551-569.

UGOZZOLI R, WALLACE RB. Allele specific polymerase chain reaction. *Methods*. 1991;2:42-48.

WELSH J, McCLELLAND M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:7213-7218.

WOODAGE T, BASRAI M, BAXEVANIS A, HIETER P, COLLINS F. C Characterization of the CHD family of proteins. *Proc Nat Acad Sci.* 1997;94:11472-11477.

YEUNG C, HUANG Y, LI S. Development of polymorphic microsatellite markers for the Steere's Liocichla (*Liocichla steerii*). *Mol Ecol Notes*. 2004;4:420-422.

ZÚÑIGA C, RAMÍREZ N. Identificación del sexo en aves mediante la amplificación del gen CHD-1 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [Tesis de pregrado] Bogotá: Facultad de Ciencias de la Salud, Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2008.