

CIRCULAR TÉCNICA

ISSN 1517-4778
setembro, 2000

Número 11/2000



**SEXAGEM DE AVES SILVESTRES SEM DIMORFISMO
SEXUAL VIA TOMOGRAFIA POR
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Embrapa

SEXAGEM DE AVES SILVESTRES SEM DIMORFISMO SEXUAL VIA TOMOGRAFIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Rubens Bernardes Filho^{1*}
Roberto Weider de Assis Franco¹
Antônio Pereira de Novaes¹
Fernando Siqueira Magnani²
Paulo Ancelmo Nunes Felipe³
Eliana Ferraz Santos³

1. Introdução

Estima-se que pelo menos metade das aves existentes no mundo não possuem dimorfismo sexual (Griffiths, 2000). Este fator representa um problema para a conservação e a pesquisa científica de tais espécies, requerendo a utilização de métodos de sexagem. De acordo com a CITES (Convention on International Trade in Endangered Species) (www.cites.org, 2000), no Brasil existem 22 ordens de aves ameaçadas de extinção, e algumas destas não apresentam dimorfismo sexual (Sick, 1986), como por exemplo os Piciformes (Tucanos), Psittaciformes (Araras, Papagaios), Gruiformes (Seriemas), Cuculiformes (Anu Branco, Anu Preto), Strigiformes (Corujas, Murucututus), Ciconiiformes (Garças, Guarás, Jaburu) e Apodiformes (Beija-flores).

A Legislação Ambiental Brasileira (Portaria 005/91-N), obriga o acasalamento de animais da fauna nativa, mantidos em cativeiro, ameaçados de extinção. A fiscalização do cumprimento desta lei é competência do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e

¹Embrapa Instrumentação Agropecuária – R. 15 de novembro, 1452, CP 741, 13560-970, São Carlos, SP. (* rubens@cnpdia.embrapa.br).

²Parque Ecológico de São Carlos “Dr. Antônio Teixeira Vianna”, Estrada Municipal Guilherme Scatena km 02, São Carlos, SP (pesca@pesca.org.br).

³Bosque dos Jequitibás, R. Coronel Quirino, 2, Bairro Bosque dos Jequitibás, 13025-000, Campinas, SP.

dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Assim, zoológicos, criadouros conservacionistas, científicos ou comerciais constantemente necessitam da sexagem dos animais para formação de pares com vistas à reprodução.

A identificação de sexo em animais é realizada por endoscopia do abdômen, bandagem cromossômica ou pela análise de DNA. A endoscopia é uma técnica traumática e invasiva que pode causar infecções. A coleta de material para a cultura de células para bandagem cromossômica também é traumática, e por vezes pode ocasionar infecção nos folículos das penas arrancadas. A determinação por DNA exige a coleta de material com altíssimo grau de pureza, pois qualquer contaminação pode mascarar o resultado do exame. Além disso, também é uma técnica invasiva, podendo causar infecções. Este método requer uma estatística na obtenção dos dados, o que aumenta o tempo necessário para se obter o resultado final (Taberlet *et al.*, 1999).

Neste trabalho é proposta a aplicação da Tomografia por Ressonância Magnética Nuclear (TRMN) para a sexagem de aves. Esta técnica tem sido normalmente utilizada para diagnóstico em seres humanos, pois permite a visualização de tumores e verificação da integridade e forma de órgãos e ossos. Por se tratar de uma técnica inócua, a TRMN tem sido amplamente difundida como ferramenta fundamental de diagnóstico na medicina moderna, tendo como vantagem em relação as outras tomografias a possibilidade de se obter imagens multiplanares, e não utilizar radiação ionizante.

As imagens obtidas por TRMN são geradas a partir da observação dos núcleos de hidrogênio (^1H), que são abundantes nos animais. A diferença de concentração de água, bem como a diferença na mobilidade desta molécula nos seres vivos, permite distinguir nas imagens seus órgãos internos.

Nas aves, independentemente do dimorfismo sexual, os testículos possuem forma elipsoidal e os ovários textura granular, possibilitando assim, a aplicação da TRMN para a identificação do sexo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Os animais estudados são exemplares de tucanos toco (*Ramphastos toco*) e papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*), pertencentes ao acervo do Zoológico do Bosque dos Jequitibás, da cidade de Campinas, SP. Foram analisadas também amostras de araras canindé (*Ara ararauna*), provenientes do criadouro conservacionista Antônio Benedito Aziz, de Vinhedo, SP.

As três espécies citadas são classificadas como ameaçadas de extinção, de acordo com a CITES (www.cites.org, 2000), tendo seu comércio sob rigorosa regulamentação.

Além destas aves, foi estudado um exemplar de carcará (*Polyborus plancus*) e um exemplar de gralha-de-topete (*Cyanocorax cristatellus*), oriundos do Parque Ecológico de São Carlos, SP. Ambos animais não ameaçados de extinção.

2.2 Contenção Farmacológica

Para a contenção farmacológica das aves foi aplicado Cloridrato de Ketamina em solução 5%, na dose 50mg por quilograma de peso vivo (0,05ml), associado ao Cloridrato de Xilazina a 2% na metade do volume da Ketamina (0,025ml) (Allen, *et al.*, 1998). O tempo de imobilização completa foi de 40min. Nos papagaios, houve necessidade de dobrar ou triplicar a dose, provavelmente em consequência do stresse em que se encontravam, devido ao transporte.

2.3. Tomografia por Ressonância Magnética Nuclear

Foi utilizado um tomógrafo Varian modelo Inova, operando em 85MHz. As imagens foram obtidas em uma bobina do tipo gaiola, com 14cm de diâmetro interno, e 30cm de comprimento. Foi utilizada a sequência de pulsos "spin-eco" com tempo de repetição (tr) de 2s; tempo de eco (te) de 0,030s; tempo de

aquisição de 0,005s; campo de visão de 14X30cm para as araras e o carcará e 12X15cm para as outras aves. As imagens correspondem a uma matriz 256X128, resultante da média de quatro aquisições. Cada imagem representa um plano com 2mm de espessura.

Para cada ave foi obtida inicialmente uma imagem sagital, para a identificação dos rins e localização das gônadas. Esta imagem foi obtida em 4min. Entretanto, a visualização apenas da imagem sagital pode não permitir identificação da forma da gônada. Nesta imagem foram escolhidos então uma coleção de planos coronais que eram posteriormente obtidos, confirmando assim a identificação. O tempo total de aquisição destes planos foi de 17min.

3. Resultados e Discussão

Nas aves as gônadas se localizam dorsalmente, próximo aos rins (Getty, 1981; Steiner e Davis, 1985; Altman *et al.*, 1997; Roskopf e Woerpel, 1996). Para permitir a melhor visualização destas, os animais foram posicionados no tomógrafo em decúbito ventral, numa bandeja apropriada, permitindo que os outros órgãos internos se acomodassem na porção inferior do abdômen. Isso permite a formação de um espaço entre as gônadas e as outras vísceras.

Na figura 1 é apresentado um conjunto de imagens obtidas de um exemplar de tucano-açu (*Ramphastos toco*) fêmea. Na figura 1.a é mostrada uma imagem sagital do animal, onde a parte esquerda corresponde ao dorso, a direita ao ventre, e no lado inferior se localiza a cauda. Na região dorsal observa-se os rins, e em anexo, a gônada. Nesta imagem são selecionados os planos coronais, que foram obtidos posteriormente, e estão nas figuras 1.b a 1.f. A sequência de apresentação das imagens corresponde ao sentido do ventre para o dorso.

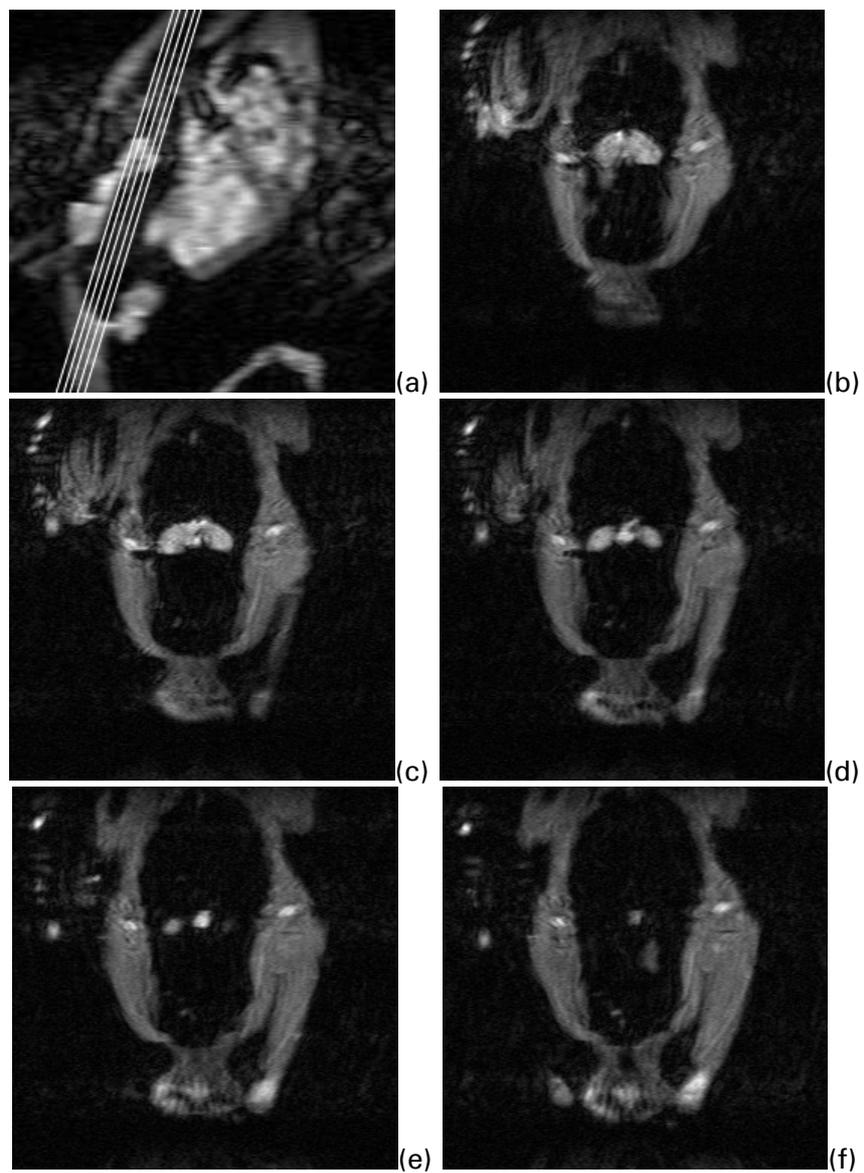


Figura 1: Sequência de imagens sagital (1.a) e coronais (1.b a 1.f) de um exemplar de tucano toco (*Ramphastos toco*) fêmea.

Na porção central da imagem coronal 1.b identifica-se a parte inferior dos rins. Observando a sequência de planos mais próximo à coluna cervical nota-se as fatias contendo uma porção menor da parte inferior dos rins, sendo que na figura 1.d visualiza-se a gônada no centro da imagem, entre os dois rins. A maior precisão para determinação da forma da gônada é obtida na figura 1.e, onde no centro na imagem é evidenciada a gônada. Ao seu lado é observado ainda a parte inferior do rim direito. O tucano analisado foi identificado como fêmea, pois possui apenas uma gônada, com formato circular, associado portanto, a um ovário.

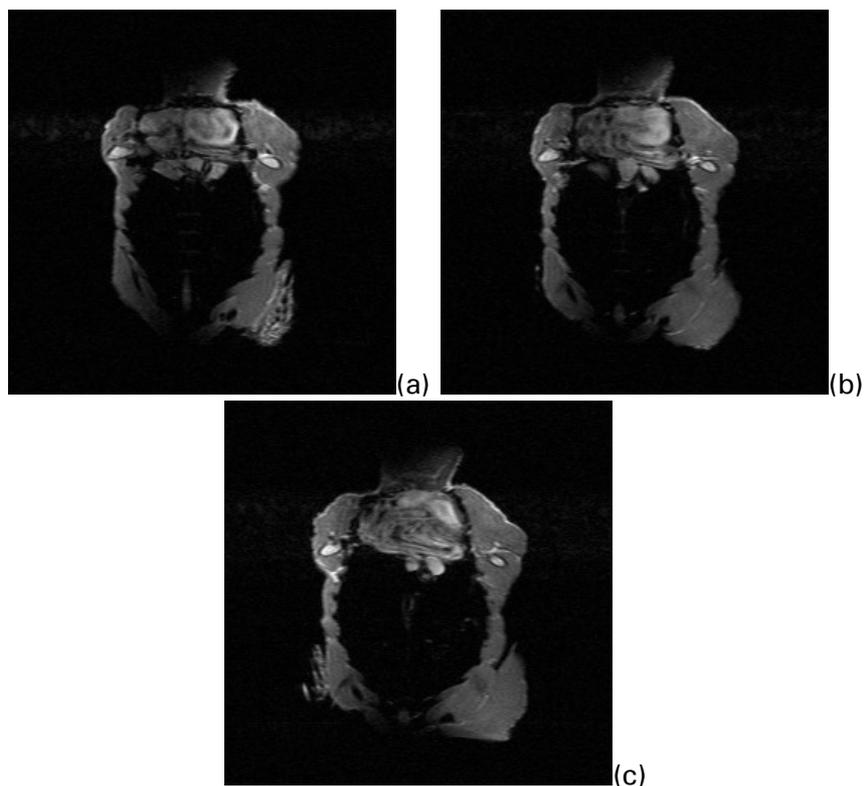


Figura 2: Imagens coronais de uma arara canindé (*Ara ararauna*) macho.

Na figura 2 é mostrada uma sequência de imagens coronais de uma arara canindé (*Ara ararauna*), obtidas no sentido dorso-ventre. O lado esquerdo das figuras corresponde ao mesmo lado na ave, e na parte inferior está a cauda do animal. Na primeira imagem (2.a) são observados os rins. Nos planos seguintes são evidenciadas as duas gônadas, com formato elipsoidal, que são características de testículos. Portanto, esta ave é uma arara canindé macho.

Na figura 3 são apresentadas duas sequências de imagens coronais de dois exemplares de papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*). Ambas mostradas no sentido do dorso para o ventre. O lado esquerdo de cada figura corresponde ao mesmo lado no animal. Na parte inferior das figuras está a cauda.

Na sequência superior (3.a - 3.c) nota-se no plano (3.a) a parte inferior dos dois rins, além de uma grande parte do rim esquerdo. Na imagem seguinte (3.b) ainda é possível observar a parte inferior do rim esquerdo, e acima dela, em tom mais claro, a gônada. Na imagem (3.c) é identificado o par de gônadas elipsoidais, que correspondem aos testículos.

Na sequência inferior (3.d - 3.f), o primeiro plano (3.d) mostra os rins, sendo mais evidenciado o rim direito. Na imagem seguinte (3.e) pode ser visualizada uma única gônada acima da parte restante do rim direito, associado ao ovário, sendo identificado portanto, como fêmea. Na região central da imagem (3.e) e (3.f) observa-se um duto, correspondente ao intestino.

Em resumo, na figura 3 são mostrados então imagens de um papagaio verdadeiro macho, na sequência superior (3.a-3.c), e uma fêmea, na sequência inferior (3.d-3.f).

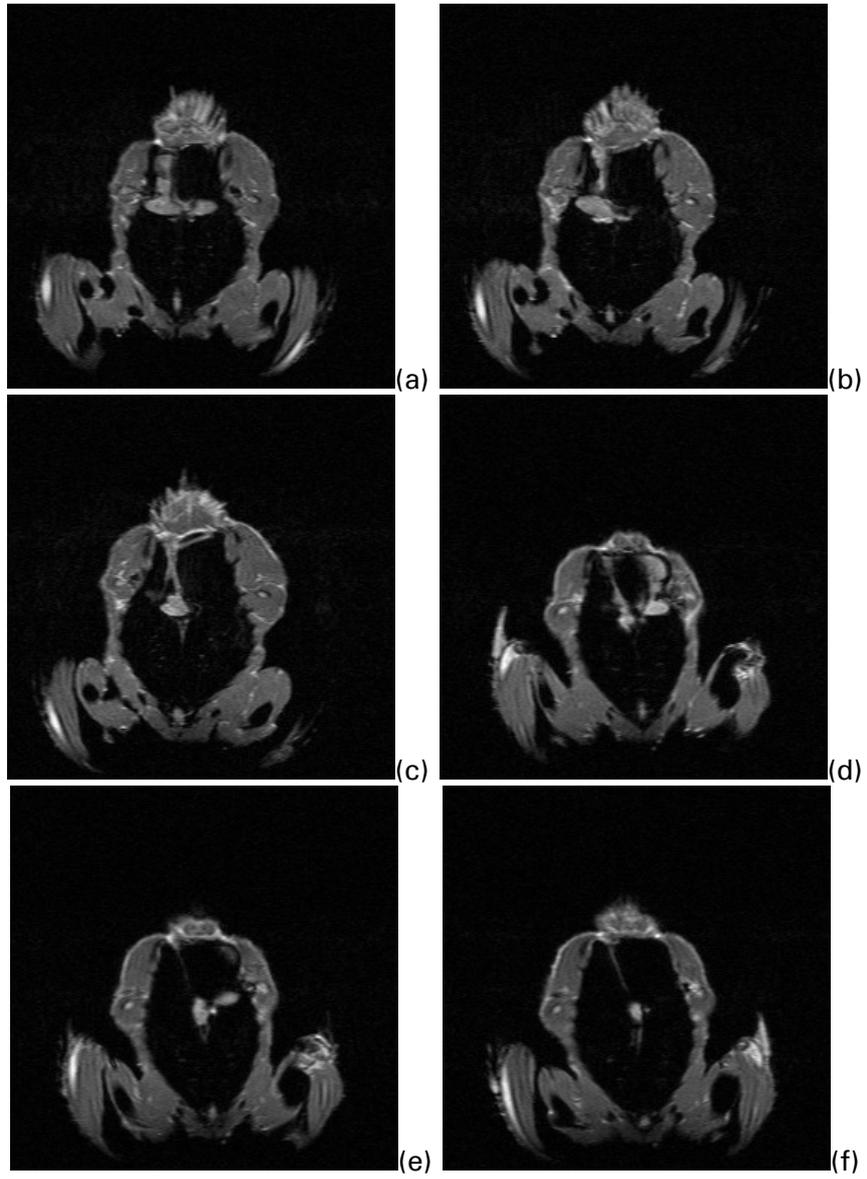


Figura 3: Imagens coronais de papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*) macho (3.a - 3.c) e fêmea (3.d - 3f).

Na figura 4 são mostradas imagens sagital (4.a) e coronal (4.b) de um carcará (*Polyborus plancus*). Na imagem sagital o lado esquerdo corresponde ao dorso, e o lado direito ao ventre. Na parte inferior é observada a cauda do animal. É indicado na figura a região em que se localiza a gônada, logo a direita dos rins, e a esquerda das outras vísceras. Esta imagem não é suficiente para a identificação da gônada da ave. Assim, foram obtidas imagens coronais do carcará a partir da imagem sagital. Na figura (4.b) é apresentado apenas o plano coronal em que se encontra a gônada, sendo observado apenas uma estrutura, caracterizando um animal fêmea.

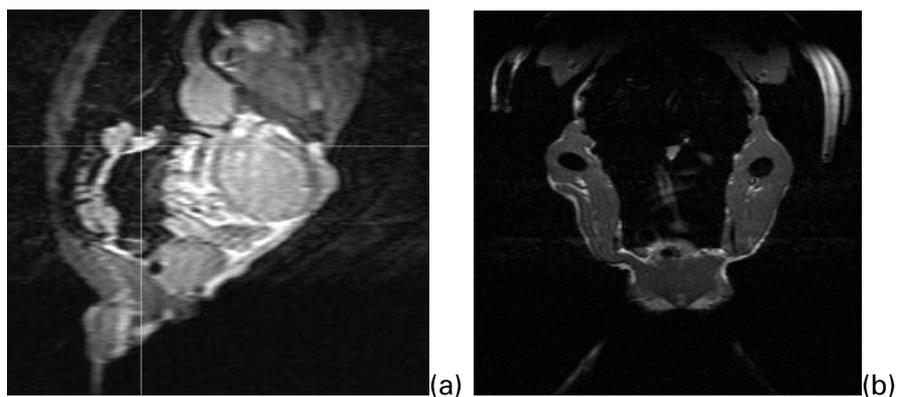


Figura 4: Imagens sagital (4.a) e coronal (4.b) de um carcará (*Polyborus plancus*) fêmea.

A tomografia por RMN, quando comparada com essas técnicas é rápida, pois requer 30 minutos para a obtenção do resultado, enquanto na técnica de bandagem cromossômica é necessário o prazo de uma semana. O tempo gasto para a sexagem por DNA é superior a uma semana. Além do aspecto de tempo reduzido de análise, a TRMN, não ocorre o risco de infecções, já que é uma técnica não invasiva.

Para realizar a sexagem através da TRMN é necessário um equipamento com maior resolução possível, pois as gônadas a

serem observadas são pequenas. O tomógrafo utilizado neste trabalho possui uma resolução pelo menos 10 vezes maior que a obtida em equipamentos de uso hospitalar.

A sexagem de aves por TRMN, além ser aplicada para o estudo de aves que não apresentam dimorfismo sexual, pode também ser indicada em aves que possuem diferenciação sexual e estão ameaçadas de extinção. Isto porque através da TRMN pode-se avaliar o tamanho das gônadas, permitindo determinar o ciclo reprodutivo das aves. De acordo com o CITES (www.cites.org, 2000), no Brasil existem 22 ordens de aves ameaçadas, totalizando 804 espécies.

4. Conclusões

É proposto a aplicação da Tomografia por Ressonância Magnética Nuclear (TRMN) para a identificação de sexo em aves, mediante obtenção de imagens das gônadas de animais adultos. Foram apresentados exemplos da eficiência desta técnica em alguns exemplares de aves brasileiras de diferentes ordens e tamanhos. A técnica é inócua, e permite que a identificação do sexo seja realizada em 30 minutos, enquanto em outros métodos o tempo necessário para a sexagem é pelo menos uma semana. Além disso, a TRMN permite estimar o estágio do ciclo reprodutivo dos animais, a partir do monitoramento do tamanho das gônadas, podendo então ser amplamente utilizada para auxiliar a procriação em cativeiro, mesmo em aves que apresentem dimorfismo sexual .

5. Agradecimentos

Marli Penteado, Bióloga do IBAMA, São Paulo, SP; Antônia Garcia Ramos, do Criadouro Conservacionista Antônio Benedito Aziz, Vinhedo, SP; Prof. Manuel Martins Dias Filho, da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

Este trabalho foi financiado pelo RHAE/CNPq - Projeto IDAN (360256/99-6) e pelo projeto Embrapa 12.0.98.816.

6. Referências Bibliográficas

- ALLEN, D.G.; PRINGLE, J. K.; SMITH, D.A.; PALOSKE, K.
Handbook of veterinary drugs, Lippincott Raven:Philadelphia,
2ed., 866p., 1998.
- ALTMAN, R.B.; CLUBB, S.L.; DORRETEIN, G.M.; QUESENBERRY,
Y.K. Avian medicine and surgery, W.B. Saunders:
Philadelphia, 1070p., 1997.
- Convention on International Trade in Endangered Species (CITES),
www.cites.org , 2000.
- GETTY, R., Anatomina dos animais domésticos, Interamericana:
Rio de Janeiro, 5ed., 2000p, 1981.
- GRIFFITHS, R., Sex identification in birds. Seminars in Avian and
Exotic pet Medicine, 9:(1) 14-26, Jan. 2000.
- Portaria 005/91-N, de 25/04/1991, Diário Oficial da União n.º 80,
26/04/1991, Seção I, Página 7.796.
- ROSSKOPF, W.; WOERPEL, R., Diseases of cage and aviary birds,
Willans & Wilhen:Philadelphia, 3ed., 1088p, 1996.
- SICK, H., Ornitologia brasileira, 2ed., UNB:Brasília, 1986.
- STEINER, C.V.; DAVIS, R.B., Patologia de aves enjauladas, Temas
selecionados, Acribia:Zaragoza, 165p., 1985.
- TABERLET, P.; WAITS, L. P.; LUIKART, G., Noninvasive genetic
sampling: look before you leap. Trends in Ecology &
Evolution, 14:(8), 325-327, 1999.