



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETERMINACIÓN DEL SEXO EN FALCONIFORMES  
MEXICANOS POR MÉTODOS MOLECULARES**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**EDUARDO AGUILAR HUERTA**

ASESORES:

DR. ROGELIO A. ALONSO MORALES

DR. GARY GARCÍA ESPINOSA



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo con mucho cariño a mis padres **Elvira Huerta Salazar** y **Valerio Aguilar Pérez**, quienes me dieron la vida y siempre me brindaron todo su amor y apoyo incondicional para seguir adelante. A mis hermanos **Gabriela, Adriana y Alejandro Aguilar Huerta**, y mi sobrina **Valeria V. Aguilar** por estar conmigo siempre dándome todo su cariño y apoyo.

A todo mis amigos de la Preparatoria 5 con los que compartí grandes momentos de mi vida, en especial a **Jonathan Flores, Israel Sanabria y Pablo Cervantes**.

A mi gran amigo de la facultad **Abel Zapata Arenas**, que siempre estuvo conmigo en las buenas y en las malas.

A mis amigos del laboratorio de Genética Molecular en especial a **Pablo Pintor, Emilio Venegas, Fernando Chávez, Héctor Flores, Alejandro Valdéz, Diana Sánchez** y **Guillermo Gálves** por su apoyo y su forma de hacer más amena la estancia en el laboratorio.

Y muy en especial le dedico este trabajo a mi novia **Carmen Aldonza Núñez Gracia** porque siempre me apoyó a seguir adelante durante toda la carrera y me enseñó a enfrentar todos los retos que impone la vida siempre estando a mi lado.

**A TODOS MUCHAS**

**GRACIAS**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la **UNAM** por otorgarme la oportunidad de desarrollarme en todos los aspectos de mi vida, y formarme como un profesional competitivo. En especial la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** y a la **Preparatoria #5 “José Vasconcelos”**.

Agradezco al **Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales** por brindarme su confianza y permitirme realizar esta tesis, que sin su apoyo no se hubiera podido lograr.

Al **Dr. Gary García Espinosa** que me impulsó en mi desarrollo profesional y siempre estuvo pendiente en la realización de este trabajo.

A la **Bióloga Amanda Gayosso Vázquez** por apoyarme en el Laboratorio de Genética Molecular en todos los análisis realizados.

Al **Dr. Emérito Carlos Galina Hidalgo** que fue mi ejemplo a seguir.

También quiero agradecer a los miembros de mi jurado el **Dr. Reynaldo V. Moreno Díaz, Dr. Raúl Ulloa Arvizu, Dr. Reyes López Ordaz** y al **Dr. Ricardo Walter Czaplewski Cicero**, por haber revisado y mejorado este trabajo con sus aportaciones.

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Hipótesis</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Justificación</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Objetivo general</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Objetivos específicos</b>	<b>8</b>
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Colección de muestras</b>	<b>8</b>
<b>2.2 Extracción de ADN</b>	<b>10</b>
<b>2.3 PCR</b>	<b>10</b>
<b>2.4 ARMS</b>	<b>11</b>
<b>2.5 Análisis</b>	<b>13</b>

<b>3. RESULTADOS</b>	<b>14</b>
<b>3.1 PCR</b>	<b>14</b>
<b>3.2 ARMS</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Análisis</b>	<b>19</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>22</b>
<b>5. REFERENCIAS</b>	<b>27</b>
<b>6. ANEXOS</b>	<b>30</b>
<b>Anexo I: Mini-purificación de ADN</b>	
<b>nuclear a partir de sangre</b>	<b>30</b>
<b>Anexo II: Resultados del análisis ciego.</b>	<b>31</b>

## RESUMEN

**AGUILAR HUERTA EDUARDO. Determinación del sexo en falconiformes mexicanos (bajo la dirección de Dr. Rogelio A. Alonso Morales y Dr. Gary García Espinosa).**

El orden *Falconiforme* está representado por 281 especies a nivel mundial, la mayoría de ellas se encuentran en algún grado de amenaza y 40 de ellas se encuentran en peligro de extinción debido a que son especies extremadamente vulnerables. En México, todos los falconiformes se encuentran en algún grado de amenaza y se han presentado tres casos de extinción. La mayoría de las aves rapaces no tienen dimorfismo sexual claro que permita diferenciarlas fácilmente, por esta razón se utilizaron dos métodos moleculares de sexado genético, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

El primer método basado en la diferencia de tamaño que existe entre el intrón del gen Cromo-helicasa-DNA-Z y el gen Cromo-helicasa-DNA-W, emplea dos iniciadores secuenciados a partir de dicho intrón.

El segundo método llamado Sistema de la Amplificación Refractaria de la Mutación, se basa en la diferencia de secuencia que existe en ambos alelos de este gen, utilizando tres iniciadores, uno de ellos específico de falconiformes, el cual permite diferenciar la mutación puntual entre los alelos de este gen.

Con el primer método sólo se logró diferenciar el sexo de una de las 12 especies analizadas.

En cambio por el segundo método se logró diferenciar nueve de las 12 analizadas, obteniendo una sensibilidad promedio de 91.78% y una especificidad de 79.45%. Este método es simple, confiable, no isotópico, no requiere de digestión con enzimas de restricción y de análisis de secuencias de nucleótidos de los productos de la PCR.



# DETERMINACIÓN DEL SEXO EN FALCONIFORMES MEXICANOS POR MÉTODOS MOLECULARES.

## 1. INTRODUCCIÓN

La clase aves, es el segundo grupo de vertebrados más numeroso del mundo, conformado por más de 9 mil especies. De éstas, alrededor de 450 son aves rapaces.<sup>1</sup>

A su vez, las aves rapaces están constituidas por dos órdenes: el Stringiforme, en el cual se agrupan todas las aves rapaces nocturnas, y el *Falconiforme* que contempla a todas las aves de presa diurnas como halcones, águilas y aguilillas. Las aves rapaces se consideran de distribución mundial ya que ocupan los diferentes ecosistemas, desde los extensos bosques templados hasta las selvas tropicales y las regiones desérticas.<sup>1</sup>

El orden *Falconiforme* está representado por 281 especies a nivel mundial y están agrupadas en cuatro familias: *Carthartidae*, *Falconidae*, *Accipitridae* y *Sagittariidae*. En México solo existen tres, la *Cathartidae* representada con cinco especies, la *Falconidae* con 12 y la *Accipitridae* con 40.<sup>1</sup>

Las aves rapaces son especies extremadamente vulnerables a cualquier cambio en sus hábitos alimenticios así como en su hábitat, además de ser constantemente víctimas del comercio ilegal debido a su esplendor y majestuosidad.<sup>1,2,3</sup> Por estas razones la mayoría de las aves rapaces están en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN por sus siglas en inglés) y 40 especies se encuentran en peligro de extinción.<sup>4</sup> En México la mayoría de los falcónidos se encuentra bajo

algún grado de amenaza, y tres especies están extintas: el Cóndor californiano (*Gymnogyps californianus*), el Caracara come cacao (*Daptrius americanus*) y el Quelele de Guadalupe o Caracara quebranta-huesos de Guadalupe (*Caracara plancus lutosus*).<sup>1,5</sup> Por lo tanto, la conservación de este tipo de especies es primordial, así como el desarrollo de más estudios científicos, que contribuyan con esta tarea, como los relacionados con la identificación del sexo, ya que resultan clave para los programas de reproducción y conservación de este tipo de especies.<sup>2</sup>

El 60% de todas las especies de aves presentan monomorfismo sexual lo que dificulta la identificación del sexo. En aquellas especies de aves que presentan dimorfismo sexual (40% de las aves), en ocasiones puede existir dificultad para diferenciarlo.<sup>6</sup> Además, se ha estimado que en los individuos adultos, arriba de un 50% no se le identifica correctamente el sexo y en aves de nido el porcentaje se eleva.<sup>2, 7, 8</sup> Como muchas otras especies de aves, las rapaces no expresan un alto grado de dimorfismo sexual, y en algunas de estas especies el sexo se llega a diferenciar por el tamaño corporal o características del plumaje en etapa adulta.<sup>2, 3</sup> Existen muchas técnicas usadas para la determinación del sexo en aves monomórficas, entre ellas están la laparoscopia, laparotomía, exploración externa de la cloaca, exámenes bioquímicos, y análisis citogenéticos. Estos dos últimos métodos tienen el inconveniente de requerir mucho tiempo, altos costos y seguridad menor al 98%; y los métodos quirúrgicos pueden arriesgar la salud y vida del ave.<sup>9, 10</sup>

A mediados de los años 90's se establecieron con éxito los métodos biológico-moleculares, vinculados con genes encontrados en los cromosomas sexuales.<sup>11</sup>

El sexo en las aves esta determinado genéticamente por el cromosoma Z y el W, las hembras son el sexo heterogamético (ZW) y los machos homogaméticos (ZZ), lo cual permite asegurar que existen una diferencia entre las secuencias genéticas de hembras y la secuencia genética en los machos.<sup>12,13</sup>

El gen Cromo-helicasa-DNA (CHD) fué encontrado por primera vez en el genoma de los ratones y codifica para la proteína del mismo nombre, la cual participa en la regulación de la trascrición de la cromatina.<sup>13</sup> Este gen también se ha encontrado en los cromosomas Z y W de las aves, pero con diferencias entre sí por tener un intrón (región no codificante del gen) de diferente tamaño entre el alelo Z y W, que permite diferenciarlos por métodos moleculares.<sup>12</sup>

Se han utilizado distintas técnicas moleculares para la identificación del sexo a partir de diferenciar los genes CHD-W y CHD-Z. Una de estas técnicas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), la cual se ha utilizado en muchas especies de aves de distintos órdenes, teniendo resultados satisfactorios para algunas de ellas.<sup>7,9,12</sup> Sin embargo en algunas otras este método no es efectivo, como en el caso del Pavón (*Oreophasis debianus*) en el cual se necesita de enzimas de restricción para la diferenciación de machos y hembras;<sup>14</sup> los Chiviscoyos o Codorniz dedilarga (*Dactylortyx thoracicus*) en la cual no existe aún un método diagnóstico; el Cisne negro (*Cygnus atratus*) especie en la que se utilizan tres iniciadores específicos en una misma reacción de PCR;<sup>10</sup> las aves marinas *Aethia pusilla*, *Aethia cristatela* y *Cyclorhynchus psittacula*, en las

que utilizan iniciadores específicos;<sup>15</sup> y en la mayoría de los falconiformes del mundo.

En la familia *Accipitrinidae*, este método de sexado tampoco distingue entre machos y hembras debido a que el tamaño del fragmento de ADN entre CHD-W y CHD-Z es de 2-8 pares de bases (pb), comparado con las 20 pb en la familia *Falconidae*.<sup>2,3</sup>

Un método utilizado recientemente es el Sistema de la Amplificación Refractaria de la Mutación (Amplification refractory mutation system [ARMS] por sus siglas en inglés) el cual se ha empleado en la determinación del sexo en rapaces de Japón.<sup>2</sup> La técnica del ARMS está basada en PCR con la característica de que puede diferenciar un nucleótido entre CHD W y CHD Z. Esta técnica emplea dos iniciadores que amplifican el segmento homólogo de ambos cromosomas sexuales y un iniciador alelo específico que se aparee solo con el cromosoma W. Estos tres iniciadores se emplean en una misma reacción de amplificación, diagnosticando a los machos cuando aparece una sola banda, que corresponde al segmento del cromosoma Z, mientras que en el caso de las hembras, aparecen dos bandas, que corresponden al cromosoma Z y una más pequeña que corresponde al cromosoma W.<sup>2,16</sup> Este sistema es simple, confiable, no isotópico, no requiere de digestión con enzimas de restricción y del análisis de secuencias de nucleótidos de los productos de la PCR.

Este trabajo se realizó con el propósito de implementar el método de ARMS para el sexado en aves rapaces endémicas mexicanas, debido a que en México no se había implementado esta técnica. La identificación del sexo facilita en gran parte el estudio del comportamiento de los individuos en una población, el

comportamiento reproductivo, los cambios evolutivos que se han presentado en estas especies, y es útil para realización de otros estudios genéticos.

## **1.1 HIPÓTESIS**

El diagnóstico molecular del sexo en falconiformes mexicanos puede ser obtenido por medio del sistema de amplificación refractaria de la mutación (ARMS).

## **1.2 JUSTIFICACIÓN**

La mayoría de las aves rapaces mexicanas se encuentran en algún grado de amenaza de extinción. Para poder mejorar los niveles de riesgo de las poblaciones de estas especies se realizan programas de reproducción en cautiverio, pero al no tener un dimorfismo sexual evidente, los individuos son sometidos a técnicas quirúrgicas para determinar el sexo, poniendo así en riesgo la vida del ave. Además de los programas reproductivos, la determinación del sexo es importante para el estudio del comportamiento tanto poblacional como reproductivo, en programas para la conservación de las especies, en estudios de evolución, ecológicos, así como en investigaciones genéticas.

El Sistema de Amplificación Refractaria de la Mutación ha demostrado ser una herramienta útil en la determinación del sexo en falconiformes, siendo un método que no pone en riesgo la vida del ave, es rápido, sencillo y se puede realizar en cualquier laboratorio que realice PCR.

### **1.3 OBJETIVO GENERAL**

Implementar el método de ARMS y evaluarlo en algunas especies de Falconiformes mexicanos.



## 1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desarrollar la metodología de ARMS empleando ADN de las especies de referencia: Halcón peregrino (*Falco peregrinus*) y Águila real (*Aquila chrysaetos*), estudiadas por Ito *et al.*<sup>2</sup> quienes desarrollaron la técnica.
- b) Evaluar si el método de ARMS discrimina el sexo de las especies de falconiformes mexicanos agrupados en las siguientes familias:
  - *Falconidae*: Cernícalo americano (*Falco sparverius*) y Halcón aplomado (*Falco femoralis*).
  - *Accipitridae*: Águila cola roja (*Buteo jamaicensis*), Águila cola blanca (*Buteo albicaudatus*), Aguililla de Harris (*Parabuteo unincinctus*), Águila negra (*Buteo gallus*), Aguililla de Swainson (*Buteo swainsoni*), Aguililla gris (*Buteo nitidus*).
  - *Carthartidae*: Caracara (*Caracara plancus*) y Zopilote (*Coragyps atratus*).
- c) Obtener los valores de sensibilidad y especificidad que presenta la técnica del ARMS.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### *2.1 Colección de muestras*

Se obtuvieron muestras de sangre de 12 especies de aves rapaces endémicas, 10 con sexo conocido mediante laparotomía y dos cuyo sexo era desconocido. Las muestras obtenidas se muestran en la Cuadro 2.1.

**Cuadro 2.1 Muestras de sangre de falconiformes obtenidas para el estudio.**

Familia	Nombre común	Nombre científico	Hembras	Machos	Total
<i>Falconidae</i>	Halcón peregrino**	<i>Falco peregrinus</i>	4	1	5
	Cernícalo Americano	<i>Falco sparverius</i>	6	1	7
	Halcón aplomado	<i>Falco femoralis</i>	1	–	1
<i>Accipitridae</i>	Águila real **	<i>Aquila chrysaetos</i>	6	1	7
	Águila cola blanca	<i>Buteo albicaudatus</i>	1	1	2
	Águila cola roja	<i>Buteo jamaicensis</i>	12	6	18
	Aguililla de Swainson	<i>Buteo swainsoni</i>	–	1	1
	Aguililla de Harris	<i>Parabuteo unincinctus</i>	4	6	10
	Águila negra	<i>Buteo gallus</i>	1	–	1
	Falso azor	<i>Buteo nitidus</i>	2	2	3
<i>Carthartidae</i>	Caracara *	<i>Caracara plancus</i>	–	–	5
	Zopilote *	<i>Coragyps atratus</i>	–	–	1
<i>Total</i>			37	19	62

\* Especies cuyo sexo era desconocido

\*\* Especies de referencia

La sangre fue obtenida en capilares heparinizados, provenientes tanto del Centro para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS) los Reyes, Estado de México; así como de ejemplares pertenecientes a personas dedicadas a la cetrería.

## 2.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por medio de la técnica de salado, descrita por Miller *et al.*<sup>17</sup> con modificaciones del Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, las cuales se especifican en el Anexo I.

## 2.3 PCR

Los protocolos empleados de PCR y ARMS para el sexado, están basados en el artículo de Ito *et al.*,<sup>2</sup> con modificaciones en las condiciones empleadas de temperatura y tiempo, así como en el empleo del iniciador P8 en lugar del NP usado en dicho artículo.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20µl conteniendo MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, Tris-HCl pH 8.4 10mM, KCl 50mM, Gelatina 10ug, BSA 15ug, Triton X100 1%, 0.2mM de dNTP's, 1µM para el iniciador P2 y P8, 1U de Taq DNA Polimerasa y 100ng de ADN.

Las secuencias de nucleótidos de los iniciadores utilizados en esta técnica son:

Sentido: P8 (5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3')

Antisentido: P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3')

En el caso de P8, la "Y" y la "R" identifican nucleótidos degenerados (Y= T/C; R = A/G).

Los productos de la amplificación se visualizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 3% con amortiguador de TBE (0.44 M Tris, 0.44 M ácido bórico, 0.01 M EDTA pH8) conteniendo bromuro de etidio (0.5µg/ml) y empleando

un voltaje de 85 volts por un periodo de 2 horas. Las muestras resultantes de la PCR fueron colocadas en los pozos del gel de agarosa con amortiguador de carga (25% Ficol, 0.2M EDTA, 0.1% azul de bromofenol). Se usó como marcador de ADN de bajo rango, el plásmido pBR332 digerido con la enzima MspI. Los productos de la reacción se visualizaron con luz ultravioleta en un fotodocumentador UVP modelo: White/UV TMW Transiluminator.

En la amplificación de ADN las condiciones de temperatura y tiempo se estandarizaron por gradiente de temperatura en un termociclador PCRExpress modelo HBPX110.

## 2.4 ARMS

Para este método se utilizaron las mismas condiciones anteriormente descritas en la PCR, modificando las concentraciones de los iniciadores e incluyendo el iniciador MP. El iniciador P2 a 1 $\mu$ M y para los iniciadores P8 y MP a 1.5 $\mu$ M.

La secuencia de nucleótidos del iniciador MP es:

Antisentido MP (5'-GAGAACTGTGAAAACAG-3')

En la Figura 3.2 (tomada de Ito *et al.*<sup>2</sup>), se muestran las posiciones de los oligonucleótidos P8, P2 y MP en el alineamiento de los segmentos del gen CDH1 en los cromosomas W y Z de varias especies de aves rapaces además de la del pollo. Se indica entre paréntesis la posición del intrón y su tamaño. Se puede observar que en el extremo 5' del oligonucleótido MP en todas las secuencias del cromosoma W se encuentra de forma complementaria una T, mientras que en el cromosoma Z se encuentra una C la cual no es complementaria a la primera base

del oligonucleótido MP. Esta diferencia, aunada al cambio en la secuencia en la 4ª base (marcadas con estrellas) lleva a que se amplifique selectivamente un fragmento de 96 pb cuando está presente el cromosoma W.

NP 5'-GAGAACTGTGCAAAACAG	
P8 5'-CTCCCGAGAATGAGRAAYTG	
BK-W	TGCAAAACAG N(202) ATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAAACGCAGTA
BK-Z	----- N(200) -----G-----
Goshawk-W	TGCAAAACAG N(201) ATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAAACGCAGTA
Goshawk-Z	----- N(205) -----G-----
MH-W	TGCAAAACAG N(201) ATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAAATGCAGTA
MH-Z	----- N(205) -----G-C-----
GE-W	TGCAAAACAG N(205) ATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAAACGCAGTA
GE-Z	----- N(202) -----G-----
SH-W	TGCAAAACAG N(201) ATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAAACGCAGTA
SH-Z	----- N(205) -----G-----
MHE-W	TGCAAAACAG N(209) ATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAAACGCAGTA
MHE-Z	----- N(201) -----G-----
Falcon-W	TGCAAAACAG N(241) ATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAAATGCGGTA
Falcon-Z	----- N(221) -----GGC--A---
Kestrel-W	TGCAAAACAG N(244) ATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAAATGCGGTA
Kestrel-Z	----- N(224) -----GGC--A---
Chicken-W	TGCAAAACAG N(180) ATCAGCTTTAATGGAAATGAAGGGAGATGCAGTA
Chicken-Z	----- N(163) -----G-----A-----C-----
AAGCCTAGACTATCACTGA-5' MP	
BK-W	GGAGCAGAAGATATTCTGGATCTGATAGTGACTCCATCTCAGAAAGAAAACGACCAAAAAACGTGGACGAC
BK-Z	-----C-----A-----G-T-----A---
Goshawk-W	GGAGCAGAAGATATTCTGGATCTGATAGTGACTCCATCTCAGAAAGAAAACGACCAAAAAACGTGGACGAC
Goshawk-Z	-----C-----A-----G-T-----A---
MH-W	GGAGCAGAAGATATTCTGGATCTGATAGTGACTCCATCTCAGAAAGAAAACGACCAAAAAACGTGGACGAC
MH-Z	-----C-----A-----G-T-----A--A
GE-W	GGAGCAGAAGATATTCTGGATCTGATAGTGACTCCATCTCAGAAAGAAAACGACCAAAAAACGTGGACGAC
GE-Z	-----C-----C-----G-T-----A---
SP-W	GGAGCAGAAGATATTCTGGATCTGATAGTGACTCCATCTCAGAAAGAAAACGACCAAAAAACGTGGACGAC
SP-Z	-----C-----A-----G-----G-T-----A---
MHE-W	GGAGCAGAAGATATTCTGGATCTGATAGTGACTCCATCTCAGAAAGAAAACGACCAAAAAACGTGGACGAC
MHE-Z	-----C-----T-----G-T-----A---
Falcon-W	GGAGCAGAAGATATTCTGGATCTGATAGTGATTCCATCTCAGAAAGAAAACGACCAAAAAACGTGGACGAC
Falcon-Z	-----C-----C-----G-----A---
Kestrel-W	GGAGCAGAAGATATTCTGGATCTGATAGTGACCCCATCTCAGAAAGAAAACCAACCAAAAAACGTGGACGAC
Kestrel-Z	-----C-----T-----GG-----A---
Chicken-W	GGAGCAGAAGATATTCTGGATCTGATAGTGATTCCATCTCAGAAAGAAAACGACCAAAAAACGTGGACGAC
Chicken-Z	-----C-----A-----G-----G-----A---
TTTCCTAAATCGCTACGTCT-5' P2	
BK-W	CACGAACTATTCCTCGAGAAAATATT
BK-Z	-----
Goshawk-W	CACGAACTATTCCTCGAGAAAATATT
Goshawk-Z	-----
MH-W	CACGAACTATTCCTCGAGAAAATATT
MH-Z	-----
GE-W	CACGAACTATTCCTCGAGAAAATATT
GE-Z	-----
SP-W	CACGAACTATTCCTCGAGAAAATATT
SP-Z	-----
MHE-W	CACGAACTATTCCTCGAGAAAATATT
MHE-Z	-----
Falcon-W	CACGAACTATTCCTCGAGAAAATATT
Falcon-Z	-----C-----
Kestrel-W	CACGAACTATTCCTCGAGAAAATATT
Kestrel-Z	-----C-----
Chicken-W	CACGAACTATTCCTCGAGAAAATATT
Chicken-Z	-T-----C-----T--A-----

**Figura 3.2 Posición y secuencia de los iniciadores, secuencia del gene CHD1, y diferencia en el tamaño del intrón en distintas especies de aves rapaces y en el pollo.** Las secuencias mostradas incluyen los exones; los intrones se muestran con una N (nucleótido) y un número que indica el tamaño de esta región. Se emplean las siguientes abreviaciones; BK: *Milvus migrans*, Goshawk: *Accipiter gentilis*, MH: *Circus spinilonotus*, GE: *Aquila chrysaetos*, SH: *Accipiter nisus*, MHE: *Spizaetus nipalensis*, Falcon: *Falco peregrinus*, Kestrel: *Falco tinnuculus*, Chicken: *Gallus gallus*

## 2.4 ANÁLISIS

Establecido el método ARMS, se realizó un análisis ciego en el cual se emplearon muestras de aves rapaces con sexo conocido. Se emplearon un total de 50 muestras de las cuales 31 fueron hembras y 19 fueron machos de distintas especies. Cada muestra fue identificada con números aleatorios, con el propósito de que el operador de la prueba no conociera el sexo y la especie. Para evaluar el método del ARMS, se realizaron cuatro ensayos independientes para cada muestra. Todas las muestras fueron procesadas en dos rondas de 25 reacciones. La electroforesis se realizó en dos rondas de tres geles para cada ensayo, utilizando las mismas cámaras de electroforesis para los seis geles.

Al concluir las pruebas se confrontaron los resultados obtenidos en los cuatro ensayos con los resultados esperados. Con ello se determinó la sensibilidad (probabilidad de un resultado positivo de la prueba dada la presencia del gen) y la especificidad (probabilidad de un resultado negativo de la prueba dada la ausencia del gen) de cada prueba y por especie, utilizando las fórmulas mostradas en el cuadro 2.4.<sup>18</sup> Calculamos el promedio de los ensayos obteniendo un valor que permite evaluar estadísticamente el método.

**Cuadro 2.4. Fórmulas para el cálculo de sensibilidad y especificidad**

Resultados de la Prueba	Verdadero diagnóstico	
	Hembras	Machos
Positivo	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
Negativo	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$
$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 PCR

Las condiciones de temperatura y tiempos que obtuvieron los mejores resultados de amplificación se muestran en el cuadro 3.1.

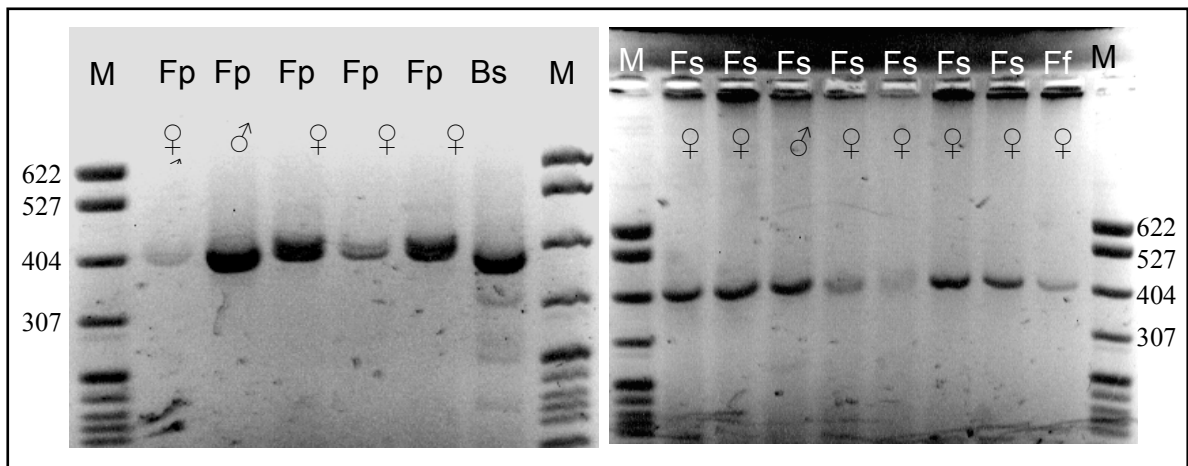
**Cuadro 3.1 Condiciones de temperatura y tiempo empleadas**

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>N° de ciclos</b>
<b>94°C</b>	<b>3min</b>	<b>1 Ciclo</b>
<b>94°C</b>	<b>30seg</b>	<b>30 Ciclos</b>
<b>50°C</b>	<b>30seg</b>	
<b>72°C</b>	<b>30seg</b>	
<b>72°C</b>	<b>3min</b>	<b>1 Ciclo</b>

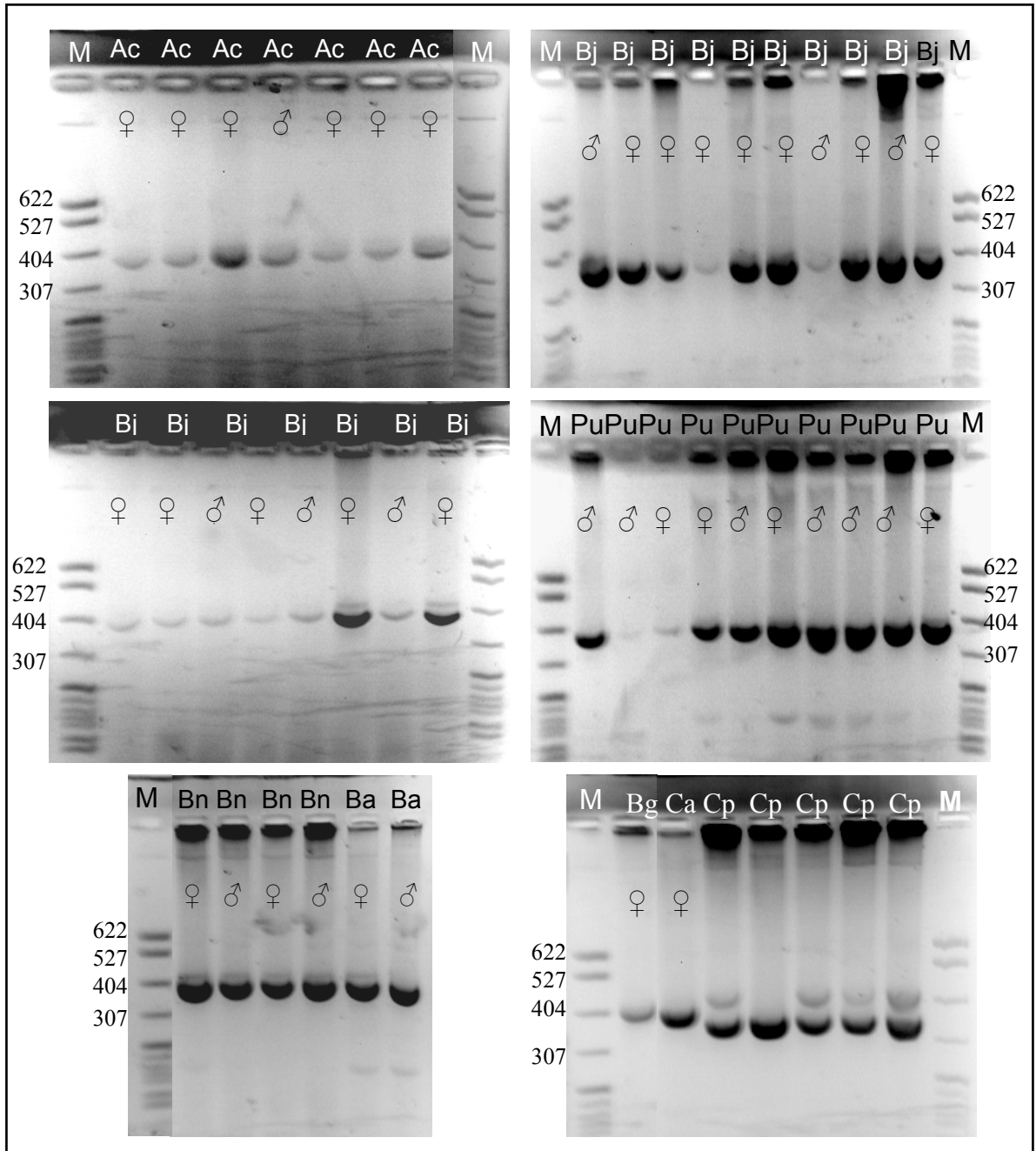
El método de sexado con los iniciadores P2 y P8, mostró resultados negativos para la determinación del sexo, debido a que sólo logró determinar el

sexo del halcón peregrino, en el cual amplificaron dos bandas para las hembras, una de ellas aproximadamente 380 pares de bases (pb) y otra alrededor de 404 pb, mientras que en el caso de los machos, una banda de 404 pb. En las demás especies, exceptuando Caracara y Zopilote, sólo se desplegó una banda de 404 pb para ambos sexos no logrando determinar el sexo. En el caso de Caracaras y Zopilote, aunque se desplegaron dos bandas no se puede determinar si el método funciona para estas especies, ya que se desconocía el sexo de estos ejemplares.

Las imágenes de los resultados se muestran en las figuras 3.1.2 y 3.1.3.



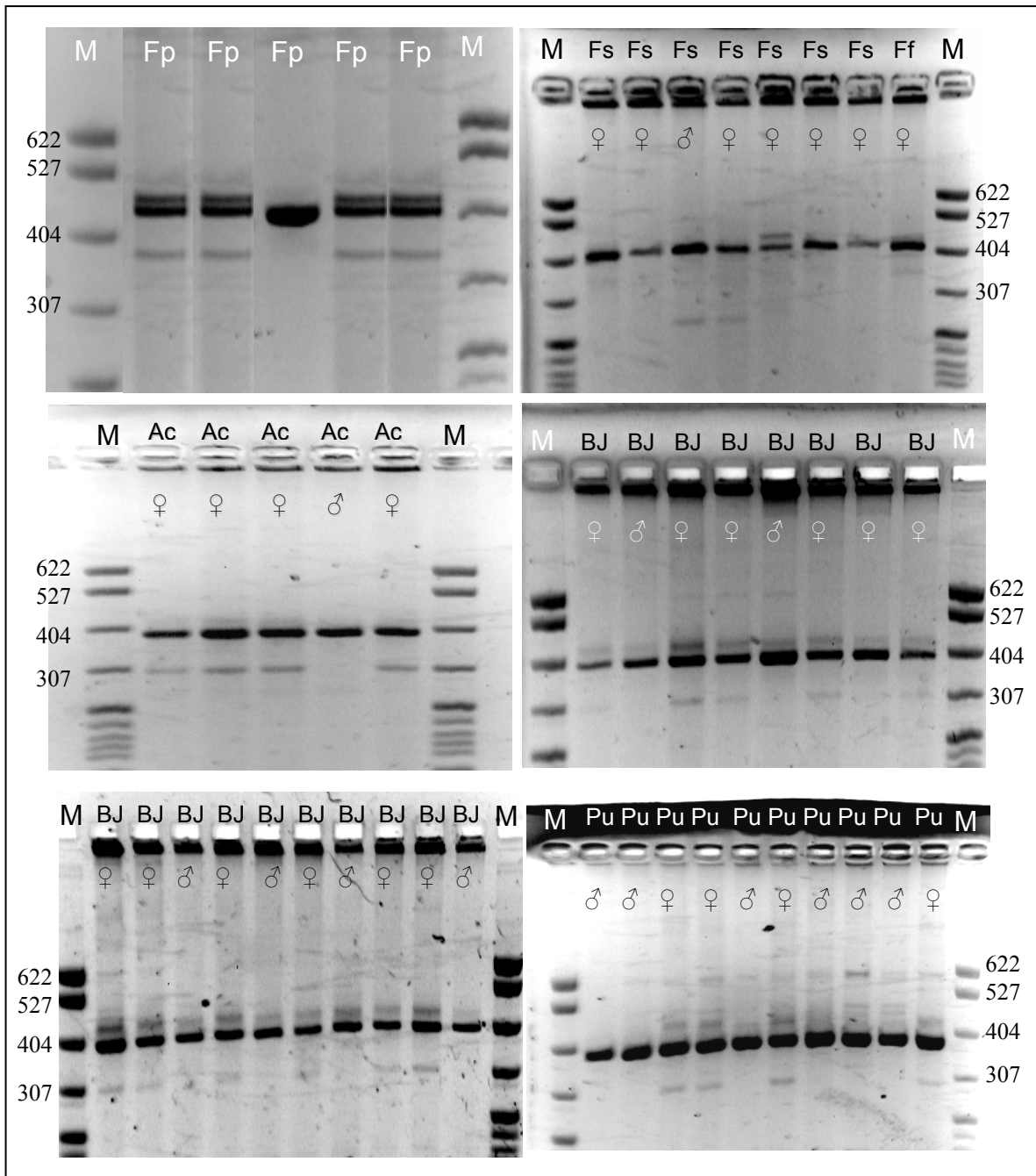
**Figura 3.1.2. Imágenes de los resultados obtenidos por el método de PCR.** Geles de agarosa al 3% con amortiguador TBE. Fp: *Falco peregrinus*, Fs: *Falco sparverius*, Ff: *Falco femoralis*, Bs: *Buteo swainsoni*. El símbolo del sexo (♂ y ♀) especifica el sexo morfológico. M: marcador de peso molecular (pBR322 digerido con enzima MspI) medido en pares de bases (pb).



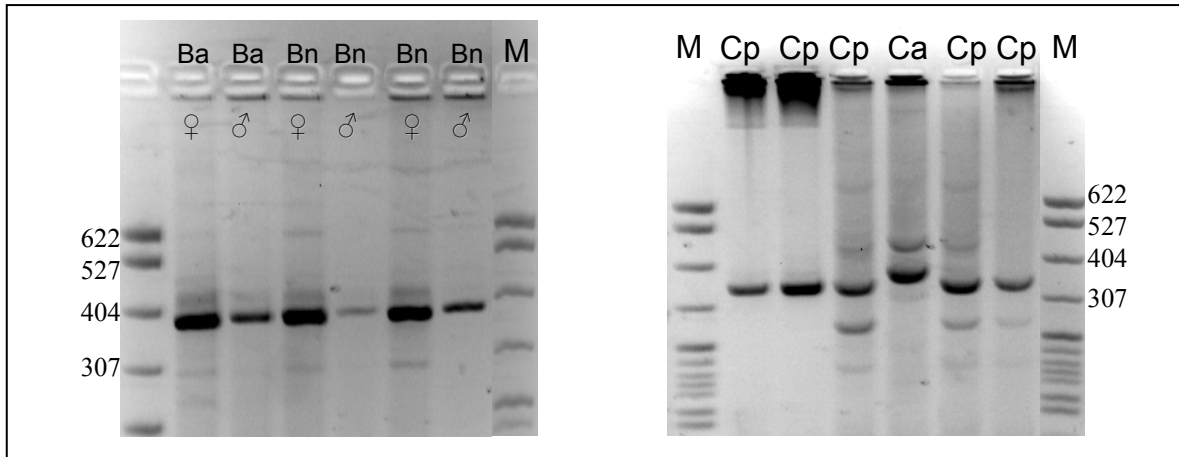
**Figura 3.1.3. Imágenes de los resultados obtenidos por el método de PCR.** Geles de agarosa al 3% con amortiguador TBE. Ac: *Aquila chrysaetos*, Bj: *Buteo jamaicensis*, Ba: *Buteo albicaudatus*, Bn: *Buteo nitidus*, Pu: *Parabuteo unincinctus*, Fs: *Falco sparverius*, Ff: *Falco femoralis*, Cp *Caracara plancus*, Ca: *Coragyps atratus*, Bg: *Buteo gallus*, Bs: *Buteo swainsoni*. El símbolo del sexo (♂ y ♀) especifica el sexo morfológico. M: marcador de peso molecular (pBR322 digerido con enzima MspI) medido en pares de bases (pb).

### 3.2 Sistema de la Amplificación Refractaria de la Mutación

El método ARMS determino el sexo de la mayoría de las especies analizadas. Para el control positivo (hembra de Águila real) se obtuvieron dos bandas, una con un peso de alrededor de 404 pares de bases (pb) y la otra de 307 pb. En el testigo negativo (macho), se observó una sola banda de aproximadamente 404 pb. En la Familia *Accipitridae* todas las especies analizadas se determinaron correctamente, mostrando en las hembras las dos bandas del testigo positivo y en los machos la una sola banda del mismo peso molecular que el testigo negativo. La familia *Carthartidae* desplegó tres bandas sugerentes a ser determinadas como hembras, y dos ejemplares desplegaron una sola banda probablemente a identificarse como machos, pero el sexo en esta familia no era conocido para confirmar que el método funciona en esta familia. Para la familia *Falconidae*, el Halcón peregrino desplegó tres bandas para las hembras: dos bandas de alrededor de 404 pb y una de menor peso molecular de aproximadamente 300 pb; en el caso de los machos sólo se obtuvo una banda de aproximadamente 400 pb. En el Cernícalo americano no se logró diferencias entre machos y hembras, desplegando una sola banda de aproximadamente 404 pb para ambos sexos; cabe señalar que esta especie muestra un claro dimorfismo sexual, por lo que se pretendía utilizar para la estandarización de la técnica. Las imágenes de este método se muestran en los cuadro 3.2.1 y 3.2.2.



**Figura 3.2.1** Imágenes de los resultados obtenidos por el método ARMS. Geles de agarosa al 3% con amortiguador TBE. Fp: *Falco peregrinus*, Ac: *Aquila chrysaetos*, Bj: *Buteo jamaicensis*, Pu: *Parabuteo unicinctus*, Fs: *Falco sparverius*, Ff: *Falco femoralis*, Bg: *Buteo gallus*, Bs: *Buteo swainsoni*. El símbolo del sexo (♂ y ♀) especifica el sexo morfológico. M: marcador de peso molecular (pBR322 digerido con enzima MspI) medido en pares de bases (pb).



**Figura 3.2.2 Imágenes de los resultados obtenidos por el método ARMS.** Geles de agarosa al 3% con amortiguador TBE. Al los extremos se encuentran el marcador de peso molecular pBR332/Map I. Ba: *Buteo albicaudatus*, Bn: *Buteo nitidus*, Cp: *Caracara plancus*, Ca: *Coragyps atratusi*. El símbolo del sexo (♂ y ♀) especifica el sexo morfológico. M: marcador de peso molecular (pBR322 digerido con enzima MspI) medido en pares de bases (pb)

### 3.3 ANÁLISIS

Los resultados del análisis ciego se muestran en el Anexo II, en donde se observa que de las 50 muestras ensayadas, sólo 7 no fueron congruentes con los resultados esperados; estos ejemplares fueron: dos Aguilillas grises de cuatro empleadas (♂, ♂), dos Águilas cola roja de 18 ejemplares (♂, ♀), una Aguililla de Harris de 10 ejemplares (♀), el ejemplar de Aguililla de Swainson (♂), y un Halcón peregrino de cinco ejemplares (♀).

El cálculo de sensibilidad y especificidad para cada ensayo se muestran en el cuadro 3.3. La prueba obtuvo una sensibilidad promedio de 0.9178, lo cual indica que la probabilidad de que se detecte las hembras como tal, es de 91.78%, y una especificidad promedio de 0.7946, lo que señala que la probabilidad de detectar un macho como macho es de 79.46%. Dichos resultados se muestran en el cuadro 3.3.1. En el cuadro 3.3.2 se observan los cálculos de sensibilidad y especificidad por especie analizada.

Cuadro 3.3. Cálculo de sensibilidad y especificidad por ensayo.

<b>Ensayo 1</b>	Hembras	Machos	$\text{Sensibilidad} = \frac{25}{25+1} = .9615$ $\text{Especificidad} = \frac{7}{7+2} = .7778$
<b>Positivo</b>	25	2	
<b>Negativo</b>	1	7	
<b>Ensayo 2</b>	Hembras	Machos	$\text{Sensibilidad} = \frac{28}{28+3} = .9032$ $\text{Especificidad} = \frac{15}{15+4} = .7895$
<b>Positivo</b>	28	4	
<b>Negativo</b>	3	15	
<b>Ensayo 3</b>	Hembras	Machos	$\text{Sensibilidad} = \frac{28}{28+3} = .9032$ $\text{Especificidad} = \frac{14}{14+4} = .7778$
<b>Positivo</b>	28	4	
<b>Negativo</b>	3	14	
<b>Ensayo 4</b>	Hembras	Machos	$\text{Sensibilidad} = \frac{28}{28+3} = .9032$ $\text{Especificidad} = \frac{15}{15+3} = .8333$
<b>Positivo</b>	28	3	
<b>Negativo</b>	3	15	

Cuadro 3.3.1 Cálculos del promedio de sensibilidad y especificidad generales.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Promedio
<b>Sensibilidad</b>	0.9615	0.9032	0.9032	0.9032	0.9178
<b>Especificidad</b>	0.7778	0.7895	0.7778	0.8333	0.7946

Cuadro 3.3.2 Cálculos de sensibilidad y especificidad por especie.

<i>Falco</i> <i>pergrino</i>	Hembras	Machos	
Positivo	3	1	
Negativo	1	0	
<i>Aquila</i> <i>chrysaetos</i>	Hembras	Machos	
Positivo	6	0	
Negativo	0	1	
<i>Buteo</i> <i>jamaicensis</i>	Hembras	Machos	
Positivo	10	1	
Negativo	1	4	
<i>Buteo</i> <i>albicaudata</i>	Hembras	Machos	
Positivo	1	0	
Negativo	0	1	
<i>Buteo nitidus</i>	Hembras	Machos	
Positivo	2	2	
Negativo	0	0	
<i>Parabuteo</i> <i>unincintus</i>	Hembras	Machos	
Positivo	6	0	
Negativo	1	8	

$Sensibilidad = \frac{3}{3+1} = .75$
$Especificidad = \frac{1}{1+0} = 1$

$Sensibilidad = \frac{6}{6+0} = 1$
$Especificidad = \frac{1}{1+0} = 1$

$Sensibilidad = \frac{10}{10+1} = .9090$
$Especificidad = \frac{4}{4+1} = .8$

$Sensibilidad = \frac{1}{1+0} = 1$
$Especificidad = \frac{1}{1+0} = 1$

$Sensibilidad = \frac{2}{2+0} = 1$
$Especificidad = \frac{0}{0+2} = 0$

$Sensibilidad = \frac{6}{6+1} = .8571$
$Especificidad = \frac{8}{8+0} = 1$



## 4. DISCUSIÓN

El sexado por medio de métodos moleculares (PCR y ARMS), aún no logra ser una técnica diagnóstica para todas las especies de aves no ratites.

Como lo muestran Griffiths *et al.*<sup>6</sup> y Jensen *et al.*,<sup>12</sup> los cuales utilizaron distintos iniciadores para el diagnóstico del sexo, se tiene que hacer modificaciones en distintos elementos de la PCR para poder determinar el sexo de algunas especies de aves.

Los resultados de nuestro trabajo concuerdan con los obtenidos por Ito *et al.*,<sup>2</sup> en donde utilizando los iniciadores descritos por Griffiths *et al.*,<sup>7</sup> no logra determinar el sexo de distintas especies de falconiformes por PCR, exceptuando el Halcón peregrino. En los ensayos con el método ARMS propuesto se pudo diagnosticar correctamente el sexo en las especies de referencia (Halcón peregrino y Águila real) así como en las demás especies de aves rapaces mexicanas incluidas en nuestro estudio, aún cuando se empleó el iniciador P8 en lugar del NP, el cual se menciona, es menos conservado en los falconiformes. Este autor no estudió especies de la familia *Carthartidae*, que si evaluamos en este estudio, pero, no podemos asegurar si el método funciona correctamente para esta familia, ya que se emplearon ejemplares con sexo desconocido. Así mismo, las condiciones de temperatura y tiempo fueron distintas a las empleadas en dicho artículo, eso se puede deber a distintos factores tales como marca de termociclador y al cambio de iniciador.

En el análisis ciego realizado, se obtuvieron tres falsos negativos y cuatro falsos positivos, lo cual indica que la prueba no es 100% segura, obteniendo una

sensibilidad de 91.78 % y una especificidad de 79.46%. Un factor por el cual la especificidad resultó baja, es la cantidad de machos que se utilizaron en la prueba (19 machos), pues al tener un solo error en ella, la especificidad desciende 5.26%. Al analizar la sensibilidad y especificidad por especie, observamos que en los casos del Águila real y Águila cola blanca se obtuvo 100% en ambos análisis; sin embargo en todas las demás especies se tiene al menos un error. Particularmente en el caso del las Aguillillas grises, los dos machos utilizados para la prueba fueron falsos positivos, lo cual nos arroja una especificidad de 0%, por lo que para determinar la causa de los resultados obtenidos para esta especie, es necesaria la secuenciación del gen CHD1W y Z. Otros factores, ajenos a la técnica de ARMS que pudieron influir en los resultados del análisis ciego, son: la contaminación del ADN, errores del realizador de la prueba y errores en la identificación de la muestra. No se encontró ningún estudio publicado que determine la sensibilidad y especificidad de las técnicas de determinación del sexo empleadas.

En la búsqueda de un sistema universal de sexado, Ellegren en 1996,<sup>13</sup> compara las técnicas de RFLP y PCR, demostrando que la técnica de RFLP no es ideal ya que no genera las mismas bandas para las distintas especies, y por ende dificulta el diagnóstico, además de ser una técnica que requiere de más tiempo y mayor costo por el empleo de enzimas. Sin embargo en este artículo el autor no emplea ninguna especie de ave rapaz.

Con el mismo propósito, Kahn *et al.*<sup>19</sup> utilizan un método de PCR empleando dos iniciadores: el 1237L y 1272H, los cuales funcionan para la mayoría de las especies que analizan; sin embargo en las Águilas cola roja y el Búho virginiano, únicas especies de aves rapaces empleadas en dicho estudio, no logran

diferenciar el sexo en contraste con las otras familias de aves. Ellos mencionan que este error puede corregirse con geles de poliacrilamida, sin que lo hayan demostrado.

Se han utilizado distintas técnicas para la identificación del sexo en especies de falconiformes además del método utilizado por Ito *et al.*,<sup>2</sup> como la de Sacchi *et al.*,<sup>3</sup> con la especie *Circaetus gallicus*, para la cual realiza una PCR como lo muestra Griffiths *et al.*,<sup>7</sup> obteniendo una sola banda para ambos sexos, por lo cual emplea enzimas de restricción, logrando tres bandas para las hembras y una sola banda para los machos. También, Chang *et al.*,<sup>20</sup> encuentra el mismo problema con *Spilornis cheela hoya* utilizando la técnica descrita por Griffiths *et al.*,<sup>7</sup> sólo que él realiza PCR con un solo iniciador P2 para CHD1 ZW ó P2 específico para CHD1 W, en la cual todas las muestras amplifican para el primer iniciador, no así para el segundo que es específico para hembras. Ambas técnicas funcionan en las respectivas especies utilizadas, sin embargo las técnicas descritas son muy específicas, no logrando que se empleen como técnicas universales en un gran número de especies, además de ser un proceso más extenso y costoso, por el empleo de enzimas de restricción. En el método de ARMS estas desventajas no existen, ya que al emplear una sola PCR, sin enzimas de restricción, se disminuyen los tiempos y los costos del diagnóstico.

En la identificación del sexo en falconiformes también se ha empleado el uso de microsatélites, como lo muestran May *et al.*<sup>21</sup> y Nesje y Roed.<sup>8</sup> May *et al.* emplea distintas especies de aves rapaces, entre ellas cuatro estudiadas en este trabajo (*Buteo jamaicensis*, *Parabuteo unicinctus*, *Aquila chrysaetos* y *Falco peregrinus*), mientras que Nesje y Roed<sup>8</sup> que empleó *Falco peregrinus* y *Aquila*

*chrysaetos*. Ambos muestran en sus respectivos trabajos, que el uso de esta técnica puede tener falsos negativos, incluso, Nesje y Roed<sup>8</sup> aclaran que los resultados deben ser leídos con precaución para no determinar hembras como machos.

La identificación del sexo por medio de Análisis Citométrico de Flujo, utilizado por De vita *et al.*,<sup>22</sup> muestra que podría aplicarse para la determinación del sexo en falcónidos, específicamente para miembros de las familias *Falconidae* y *Accipitridae*, pero el resultado depende de tener bien estandarizada la preparación de las muestras y de la eficiencia del equipo citométrico; no obstante, en dos casos de las especies utilizadas en dicho estudio, el resultado fue erróneo.

Se han probado nuevas alternativas como la empleada por Chang *et al.*<sup>23</sup> en la cual se utiliza la PCR en tiempo real, teniendo buenos resultados utilizando los iniciadores universales P8 y P2; sin embargo sólo maneja una especie de *Falconiforme* (*Spilornis cheela hoya*), lo cual no demuestra que sea efectivo en otras especies, aunado a que no realiza ningún análisis estadístico que permita compararse con otros métodos de sexado. Además, presenta la desventaja económica, por los altos costos, tanto del equipo de tiempo real como de las sondas.

Los distintos métodos de sexado independientemente del tipo, tienen ciertas fallas, ya que la diferencia del intrón CHD1 ZW del CHD1 W es muy pequeña en este orden de aves. Sin embargo, la técnica del ARMS tiene muchas ventajas: se realiza en una sola PCR, no requiere de enzimas de restricción, se puede distinguir entre dos copias homólogas, es un método fácil, rápido, económico y se puede efectuar en cualquier laboratorio que realice PCR. Además, el ARMS podría

ser un método universal, aplicable a un gran número de especies de aves con mutaciones puntuales conservadas, y que no pueden ser diagnosticadas por otro método de sexado genético.

## 5. REFERENCIAS

1. Urbina TF. Aves rapaces de México. 1a ed. México: UAEM, Centro de Investigaciones Biológicas, 1996.
2. Ito h, Sudo-Yamaji A, Abe M, Murase Tetsuma, Tsubota T. Sex identification by alternative polimerase Chain Reaction Methods in Falconiformes. Zoological science 2003; 20:339-344.
3. 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*). Molecular and cellular probes 2004;18:193-196.
4. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Red List of Threatened Species. Consultada en diciembre de 2007. Disponible en: URL: <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/19742/summ>
5. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2002. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Anexo Normativo II. En línea desde marzo del 2002. Consultada en diciembre del 2007. Disponible en: URL: <http://www.semarnat.gob.mx>
6. Griffiths R, Daan S, Dijkstra C. Sex identification in birds using two CHD genes. Biological sciences 1996; 263: 1251-1256.
7. Griffiths R, Double M, Orr K, Dawson RJG. A DNA test to sex most birds. Molecular Ecology 1998; 7:1071-5.
8. Nesje M, Roed HK. Brief report. Sex identification in falcons using microsatellite DNA markers. Hereditas 2000; 132: 261-263.

9. Bermúdez HLG, García GA, Leal GCH, Riojas VVM, Jaramillo RG, Montes de Oca LR. Molecular sexing of monomorphic endangered Ara birds. *Journal of experimental zoology* 2002; 292:677-680.
10. He PJ, Yu JQ, Fang SG. Sex Identification of the Black Swan (*Cygnus atratus*) using the Locus-specific PCR and Implications for its Reproduction. *Reprod Dom Anim* 2005; 40: 196-198.
11. Griffiths R, Korn RM. A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene* 1997; 197:225–9.
12. Jensen T, Pernasetti FM, 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 Biology* 2003; 22: 561-571.
13. Ellegren H. First gene on the avian W chromosome provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 1996; 263:1635-1641.
14. Bermudez HLG, Chavez ZP, Guzmán VA, Leal GCH, Montes de Oca LR. Loss of restriction site Ddel, used for avian molecular sexing, in *Oreophaps derbianus*. *Reprod Dom Anim* 2002; 37: 321-323.
15. Dawson DA, Darby S, Hunter FM, Krupa AP, Jones I, Burke T. A critique of avian CHD-Based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. *Molecular ecology notes* 2001; 1:201-204.
16. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalshekerl N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The

- amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research* 1989; 7: 2503-2516
17. Miller SA, Dykes D, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acids Research* 1988; 16:1215.
  18. Daniel WW. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud.* 4<sup>a</sup> ed. New York: Limusa Wiley, 2002.
  19. Kahn WN, John ST.J, Quinn WT. Chromosome-specific intron size differences in the Avian CHD gen provide an efficient method for sex identification in birds. *The Auk* 1998; 115: 1074-1078.
  20. Chang HW, Chou TC, Gu DL, Cheng CA, Chang CC, Yao CT, Chuang LY, Wen CH , Chou YC, Tan KY, Cheng CC. An improved PCR method for gender identification of eagles. *Molecular and Cellular Probes* 2008; 22:184-188.
  21. May CA, Wetton JH, Parkin DT. Polymorphic Sex-Specific Sequences in Birds of Prey. *Biological Sciences* 1993; 253: 271-276.
  22. De Vita R, Cavallo D, Eleuteri P, Dell’Omo G. Evaluation of Interspecific DNA Content Variations and Sex Identification in Falconiformes and Strigiformes by Flow Cytometric Analysis. *Cytometry* 1994; 16:346-350.
  23. Chang HW, Gu DL, Su SH, Chang CC, Cheng CA, Huang HW, Yao CT, Chou TC, Chuang LY, Cheng CC. High-throughput gender identification of Accipitridae eagles with real-time PCR using TaqMan probes. *Theriogenology* 2008; 70: 83–90.



## 6. ANEXOS

### Anexo I MINI-PURIFICACION DE ADN NUCLEAR A PARTIR DE SANGRE

Tomar 1 ml de sangre en un tubo eppendorf de 2 ml.

Lavarla dos veces con 1 volumen de agua bidestilada estéril fría (vortexeando perfectamente cada vez) y centrifugando a 15,300 g/12 minutos/ 4°C.

Decantar y resuspender la pastilla en 0.5 ml de solución de lisis, complementada con RNasa (15 ug/ml final). Incubar 37°C/1H.

Adicionar de proteinasa K a una concentración final de 50 µg/ml, incubar 2h a 55°C y 1h/60°C (o bien a 50°C, toda la noche).

Agrega NaCl a una concentración final 2M, Mezclar por 15 segundos.

Centrifugar 15,300 g/10 min.

Recuperar el sobrenadante y precipitar con un volumen de isopropanol, incubar 1h a -20°C.

Centrifugar 15,300 g/10 min/4°C. Decantar.

Lavar la pastilla con 500ul etanol al 70%, centrifugando 5min/10,600 g.

Decantar y eliminar los residuos de etanol por centrifugación al vacío.

Resuspender la pastilla de DNA en H<sub>2</sub>O di-destilada estéril (aprox. 200ul) cuantificar y verificar su calidad por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

*Solución de lisis:* Tris HCL pH8 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA 20 mM, SDS 0.5%,

- El anticoagulante usado debe ser EDTA a una concentración final de 27 mM o 1% final.

## ANEXO II. RESULTADOS DEL ANÁLISIS CIEGO.

Familia	Especie	Sexo morfológico	Resultado del sexado			
			Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
<i>Falconidae</i>	<i>Falco peregrinus</i>	H	H	H	H	H
	<i>Falco peregrinus</i>	H	H	H	H	H
	<i>Falco peregrinus</i>	H	H	H	H	H
	<i>Falco peregrinus</i>	M	NA	M	M	M
	<i>Falco peregrinus</i>	H	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>
<i>Accipitridae</i>	<i>Aquila chrysaetos</i>	H	H	H	H	H
	<i>Aquila chrysaetos</i>	H	NA	H	H	H
	<i>Aquila chrysaetos</i>	H	H	H	H	H
	<i>Aquila chrysaetos</i>	M	M	M	M	M
	<i>Aquila chrysaetos</i>	H	H	H	H	H
	<i>Aquila chrysaetos</i>	H	H	H	H	H
	<i>Aquila chrysaetos</i>	H	NA	H	H	H
	<i>Buteo albicaudatus</i>	M	NA	M	M	M
	<i>Buteo albicaudata</i>	H	H	H	H	H
	<i>Buteo gallus</i>	H	H	H	H	H
	<i>Buteo swainsonii</i>	M	NA	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>
	<i>Buteo jamaicensis</i>	H	H	H	H	H
	<i>Buteo jamaicensis</i>	H	H	H	H	H
	<i>Buteo jamaicensis</i>	M	M	M	M	M
	<i>Buteo jamaicensis</i>	H	H	H	H	H
	<i>Buteo jamaicensis</i>	M	NA	M	M	M
	<i>Buteo jamaicensis</i>	H	H	H	H	H
	<i>Buteo jamaicensis</i>	M	M	M	M	M
	<i>Buteo jamaicensis</i>	H	H	H	H	H

<i>Buteo jamaicensis</i>	H	H	H	H	H
<i>Buteo jamaicensis</i>	M	NA	M	M	M
<i>Buteo jamaicensis</i>	H	NA	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>
<i>Buteo jamaicensis</i>	H	H	H	H	H
<i>Buteo jamaicensis</i>	H	H	H	H	H
<i>Buteo jamaicensis</i>	H	H	H	H	H
<i>Buteo jamaicensis</i>	M	NA	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>M</b>
<i>Buteo jamaicensis</i>	H	H	H	H	H
<i>Buteo nitidus</i>	H	H	H	H	H
<i>Buteo nitidus</i>	M	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>
<i>Buteo nitidus</i>	H	H	H	H	H
<i>Buteo nitidus</i>	M	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>
<i>Parabuteo unincinctus</i>	M	M	M	NA	M
<i>Parabuteo unincinctus</i>	M	NA	M	M	
<i>Parabuteo unincinctus</i>	H	NA	H	H	H
<i>Parabuteo unincinctus</i>	H	H	H	H	H
<i>Parabuteo unincinctus</i>	M	M	M	M	M
<i>Parabuteo unincinctus</i>	H	H	H	H	H
<i>Parabuteo unincinctus</i>	M	M	M	M	M
<i>Parabuteo unincinctus</i>	M	NA	M	M	M
<i>Parabuteo unincinctus</i>	M	NA	M	M	M
<i>Parabuteo unincinctus</i>	H	H	H	H	H
<i>Parabuteo unincinctus</i>	M	NA	M	M	M
<i>Parabuteo unincinctus</i>	H	NA	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>
<i>Parabuteo unincinctus</i>	M	M	M	M	M
<i>Parabuteo unincinctus</i>	H	H	H	H	H

H: Hembra, M: Macho, NA: Muestras no amplificadas.