

IDENTIFICAÇÃO DO SEXO DE GANSOS DOMÉSTICOS (*ANSER ANSER*): COMPARAÇÃO DA TÉCNICA DE SEXAGEM CROMOSSÔMICA E A INSPEÇÃO PÓS-ANESTÉSICA DA CLOACA

SEX IDENTIFICATION OF DOMESTIC GESE (ANSER ANSER): COMPARISON OF CYTOGENETIC ANALYSIS TECHNIQUE AND POST ANESTHETIC INSPECTION OF THE CLOACA

R. C. JUSTINO¹; C. E. S. GRUMADAS²; D. A. SHIQUE³; L. G. CAETANO⁴; A. L. DIAS⁵; M. I. M. MARTINS⁶

RESUMO

Os gansos domésticos utilizados neste experimento eram de vida livre, pertencentes a um lago localizado em uma área urbana e sua população havia aumentado dramaticamente. a necessidade de um projeto com foco na esterilização de alguns machos, para reduzir o crescimento populacional, levou à necessidade de sexagem desses animais. como os gansos domésticos apresentam mínimo dimorfismo sexual, duas técnicas foram testadas: análise citogenética e inspeção da cloaca pós-anestesia. foram utilizados oito gansos adultos, escolhidos aleatoriamente de um grupo de 80 animais. eles foram capturados com redes ou manualmente, transportados individualmente e alojados em local apropriado a espera da análise citogenética (três a quatro dias). para a sexagem cromossomal, foram coletados 2 ml de sangue e a técnica de cultura de linfócitos periféricos foi empregada. as amostras resultantes foram tratadas com kcl hipotônico, fixadas em três trocas de solução de metanol e ácido acético. as lâminas foram preparadas com a técnica padrão e examinadas ao microscópio óptico para observação das metáfases. para a técnica de eversão da cloaca, foi realizada a anestesia injetável com tiletamina-zolazepam 5%. dez minutos após a anestesia, a cloaca foi evertida para a visualização das estruturas internas e a determinação sexual. As técnicas foram conduzidas em duplo cego, para melhor acurácia dos resultados. Dos oito animais submetidos à técnica de sexagem cromossomal, cinco foram identificados como machos e três como fêmeas, alcançando 100% de concordância quando comparada com a técnica de eversão da cloaca. A técnica de sexagem cromossomal aparentou causar o menor desconforto nos animais avaliados, mostrando-se uma técnica confiável para determinação sexual e favorável ao bem-estar animal.

PALAVRAS-CHAVE: Aves. Cariótipo. Citogenética. Cloaca. Contenção química. Falo.

SUMMARY

The domestic geese used in this experiment were free-living, from a lake located in an urban area and its population had increased dramatically. The need for a project proposing the sterilization of some males to restrain population growth, led to the need for sexing these animals. As domestic geese present minimal sexual dimorphism, two techniques were tested: cytogenetic analysis and post anesthetic inspection of the cloaca. There were used eight adults geese randomly chosen from a group of 80 animals. They were caught with nets or by hand, were individually transported and housed in appropriate place waiting for the cytogenetic analysis (three to four days). For the chromosomal sexing, was collected 2 mL of blood and the peripheral blood lymphocyte culture technique was used. The sample was treated with hypotonic KCl, fixed in three changes of methanol/acetic acid solution. The slides were prepared with the standard technique and examined under an optical microscope to observe the metaphase. To the technique of cloaca eversion, was performed injectable anesthesia with tiletamine-zolazepam 5%. Ten minutes after anesthesia, the cloaca has been everted to visualize the internal structures and sex determination. The techniques were performed in blinded trial to avoid inaccurate results. From the eight animals submitted to chromosomal sexing technique, five were identified as male and three as females, reaching 100% agreement when compared with the cloaca eversion technique. Sexing chromosomal technique appeared to cause the least discomfort in the animals evaluated, proving to be a reliable technique for sexual determination and favorable to animal welfare.

KEY-WORDS: Birds. Chemical restraint. Cloaca. Cytogenetics. Karyotype. Phallus.

¹Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - Universidade Estadual de Londrina.

²Professora do Departamento de Clínicas Veterinárias - Universidade Estadual de Londrina.

³Graduanda do curso de Medicina Veterinária - Universidade Estadual de Londrina.

⁴Professora do Departamento de Biologia Geral - Universidade Estadual de Londrina.

⁵Professora do Departamento de Biologia Geral - Universidade Estadual de Londrina.

⁶Professora do Departamento de Clínicas Veterinárias - Universidade Estadual de Londrina.

Autor para correspondência: Maria Isabel Mello Martins – imartins@uel.br

INTRODUÇÃO

A população de gansos (*Anser anser*) tem aumentado em alguns lagos que abastecem cidades e propriedades rurais, podendo levar à contaminação desses reservatórios (ISHII et al., 2014; FOX et al., 2006). Alguns microrganismos com potencial zoonótico já foram encontrados em gansos, como por exemplo, o vírus da Influenza A, a *Helicobacter canadensis*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* e bactérias anaeróbicas, o vírus da doença de Marek, *Cryptosporidium* e *Sarcocystis* (FILION et al., 2006; FOX et al., 2006; MCHATTERS; SCHAM, 1995; TSIODRAS et al., 2008).

O ganso doméstico (*Anser anser*) apresenta dimorfismo sexual mínimo, sendo observadas diferenças sutis em relação ao tamanho (PARÉS-CASANOVA, 2014). A identificação do sexo é fundamental para a reprodução assistida de espécies silvestres, sendo uma importante ferramenta para os estudos comportamentais e populacionais (CASTRO, 1997; FARIA et al., 2007; RASO; WERTHER, 2004). Também pode ser utilizada para melhor manejo de aves domésticas de produção (BUCKLAND; GUY, 2002).

As técnicas relatadas para sexagem de aves foram: observação direta da cloaca, laparoscopia, observação comportamental, técnicas de imagem como tomografia computadorizada e ultrassonografia, PCR e cariotipagem, a qual se baseia nas diferenças existentes entre os cromossomos sexuais (ELLENGREN, 2000; GRANDO, 2002; HILDEBRANDT et al., 1995; PEIXOTO et al., 2008; RASO; WERTHER, 2004; RICHNER, 1989; VIEIRA et al., 2009; WÓJCIK; SMALEC, 2007).

O objetivo deste trabalho foi realizar a sexagem de gansos domésticos (*Anser anser*) de vida livre utilizando duas técnicas, a análise citogenética e a eversão da cloaca para observação de falo, com o intuito de posteriormente controlar a população por meio da esterilização dos machos.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesse estudo foram utilizados oito gansos domésticos adultos de vida livre (*Anser anser*), escolhidos aleatoriamente de um grupo de aproximadamente 80 animais, provenientes das imediações de um lago artificial. Eles foram capturados com redes ou manualmente e foram transportados individualmente até o Hospital Veterinário Institucional, onde ficaram alojados em recintos adequados (aeração, insolação, piso, grade de proteção, parcialmente coberto com telhado, com água *ad libitum* e oferta de ração para gansos e folhagens verdes duas vezes ao dia – pela manhã e a tarde) a espera do resultado da sexagem cromossômica, após o qual foram reintroduzidos ao ambiente de onde haviam sido capturados.

Para a realização da sexagem cromossômica, por meio da obtenção de cromossomos mitóticos, foi utilizada a técnica de Moorhead et al. (1960), com algumas modificações. Foram necessários 2 mL de sangue, colhidos, após anti-sepsia do local com álcool

70°, pela venopunção da veia metatársica medial, sendo utilizadas seringas previamente heparinizadas com 0,1 mL de heparina sódica. Resumidamente, após 4 horas em temperatura ambiente para a sedimentação, 0,2 mL de plasma foram transferidos para um frasco contendo 7,5 mL de meio de cultura RPMI 1640 (desenvolvido no Instituto Memorial Park Roswell), 2 mL de soro fetal bovino e 0,2 mL de fitohemaglutinina. Os frascos foram mantidos em estufa com temperatura constante a 41°C por 71 horas. Posteriormente, foram adicionados 5-6 gotas de colchicina 0,05% e o material foi incubado por mais 2 horas. O conteúdo do frasco foi transferido para um tubo de ensaio e centrifugado a 900 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento ressuspenso em 8 mL de solução hipotônica de KCl a 0,075M e mantido em estufa por 20 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionadas cinco gotas de fixador metanol: ácido acético (3:1) recém-preparado, as preparações foram ressuspendidas vagarosamente e centrifugadas por 10 minutos a 900 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 8 mL de fixador. Foi realizada então uma nova centrifugação, por 8 minutos a 900 rpm, repetida por duas vezes. Após, a suspensão obtida foi diluída em cerca de 1 mL de fixador, e acondicionado em frascos plásticos de 1,5 mL, mantidos em freezer à -20°C. As lâminas foram preparadas com a técnica padrão e examinadas ao microscópio óptico para observação das metáfases, por um observador (A), depois da observação das metáfases os animais foram devolvidos ao seu ambiente.

Para o procedimento de eversão da cloaca, foi realizada anestesia injetável, com o anestésico dissociativo tiletamina-zolazepam, 10 mg/kg, via intramuscular, no músculo peitoral, em dose única. Após aproximadamente 10 minutos da aplicação do anestésico e miolorrelaxamento da cloaca, esta era evertida para observação de suas estruturas internas e a determinação do sexo por um segundo observador (B).

A forma de condução do trabalho foi em duplo cego, para melhor acurácia dos resultados. Os resultados foram avaliados qualitativamente, sendo ilustrados por fotodocumentação e porcentagem.

RESULTADOS

Dos oito animais submetidos à técnica de sexagem cromossômica, cinco foram identificados como machos (ZZ) e três como fêmeas (ZW), obtendo 100% de concordância com a técnica de eversão da cloaca. Após a confirmação do sexo dos animais pode-se observar que não havia diferenças significativas em relação ao fenótipo dos animais (Figura 1 e 2). Os cromossomos das aves se apresentaram de forma bimodal, sendo o cromossomo Z maior que o W (Figura 3).

Nos animais anestesiados para a observação da cloaca, os machos foram reconhecidos devido à presença do falo, uma estrutura amarelo-rosácea e a fêmea foi reconhecida pela presença de uma roseta enrugada mais avermelhada (Figura 4).



Figura 1 - Aspecto fenotípico do ganso 15 (macho)



Figura 2 - Aspecto fenotípico do ganso 17 (fêmea)

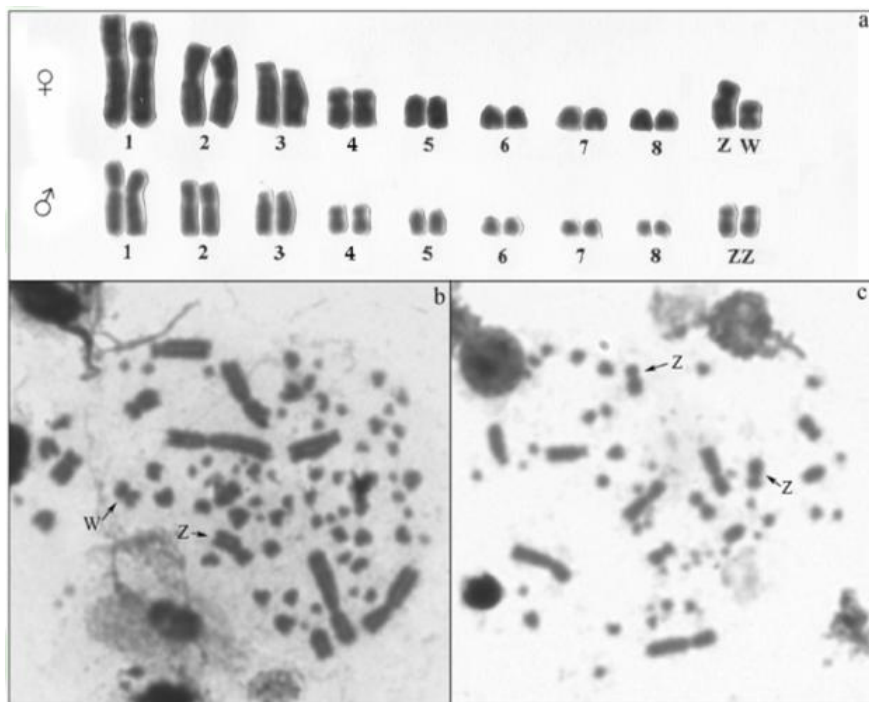


Figura 3 - a) Cariótipo parcial de exemplares de ganso doméstico (*Anser anser*) fêmea e macho; b) Metáfase de exemplar fêmea; c) Metáfase de exemplar macho.

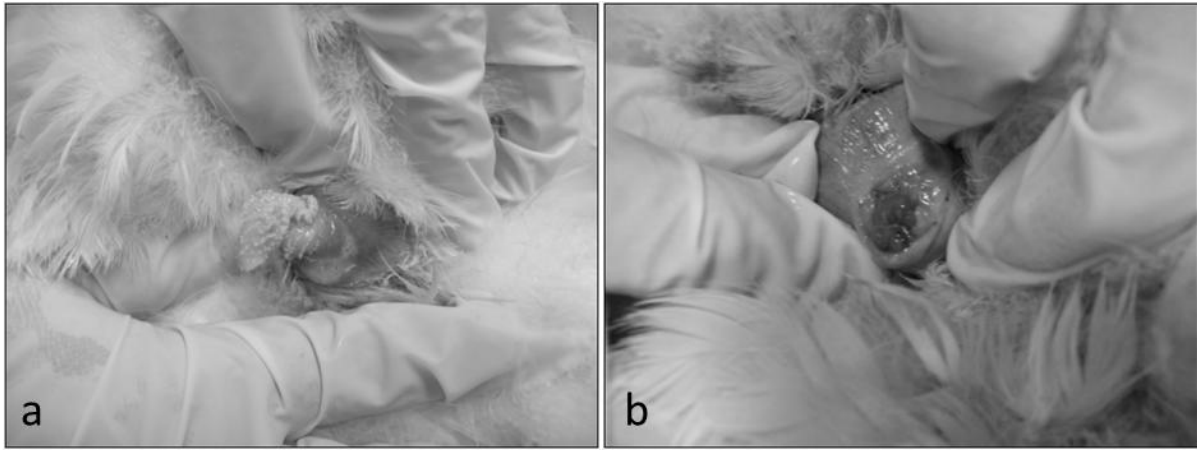


Figura 4 - Visualização de cloaca evertida de ganso macho (a) com exposição manual do falo, e de ganso fêmea (b).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho corroboraram com a hipótese de que o exame citogenético pode ser usado para sexagem de aves adultas com dimorfismo sexual sutil. Este experimento teve como foco principal o estabelecimento de uma técnica confiável, eficiente e que causasse o menor desconforto possível ao animal avaliado, visando o bem-estar animal. Os animais utilizados nesse estudo, mesmo sendo de vida livre, eram provenientes de um lago localizado em área urbana, uma área verde com grande fluxo de pessoas. Os quais foram introduzidos neste local há mais de uma década e sua população foi aumentando exponencialmente, gerando a necessidade de um projeto de identificação dos gansos machos e a esterilização de alguns desses animais, para frear a procriação e o aumento populacional.

Sabe-se que nos gansos foram encontrados microrganismos com potencial zoonótico (TSIODRAS et al., 2008). O vírus da Influenza A, a *Helicobacter canadensis* (causador de enterite), bacilos gram negativos (*Pseudomonas*, *Aeromonas*) e bactérias anaeróbicas, o vírus da doença de Marek (associado à esclerose múltipla humana). *Cryptosporidium* e *Sarcocystis* são exemplos dos patógenos que podem ser encontrados nestes animais e que sabidamente causam doenças em humanos (FILION et al., 2006; FOX et al., 2006; MCHATTERS; SCHAM, 1995; TSIODRAS et al., 2008). Além das doenças que podem ser transmitidas para os humanos, ainda há a preocupação com aquelas que podem ser transmitidas para outras aves, afetando a produção aviária (FRANZO, 2007). Aves silvestres livres ou em cativeiros, e aves domésticas não vacinadas, podem atuar como reservatório para o vírus da doença de Newcastle (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2003).

A preocupação com a qualidade da água tem recebido grande atenção por parte de grupos de pesquisas e entidades governamentais. De acordo com um grupo do Japão, a contaminação fecal por gansos selvagens é motivo de preocupação para a produção de alimentos seguros, pois podem carrear alguns

patógenos humanos, tais como *Salmonella* e *Campylobacter* spp (ISHII et al., 2014). Como grande parte dos contaminantes são carreados pelas fezes dessas aves, o aumento da densidade populacional em uma área de intenso fluxo de humanos pode potencializar a disseminação de doenças. Para refrear o crescimento populacional optou-se pela esterilização de alguns machos e, para tanto, houve a necessidade da sexagem dessas aves.

Em criações de gansos a sexagem é realizada em animais bem jovens pela exposição da cloaca, a qual é externamente igual em machos e fêmeas. O examinador fica sobre o ganso e com o indicador solta os músculos oclusores anais e em seguida com uma pressão dilatadora consegue abrir a cloaca (BUCKLAND; GUY, 2002). Reconhece-se o falo nos machos como um corpo amarelo-rosáceo e na fêmea uma roseta enrugada mais avermelhada, o que também foi verificado no trabalho (POLLOCK; OROSZ, 2002). Neste estudo não se conseguiu utilizar esta técnica, devido ao não relaxamento da cloaca somente com manipulação. Optou-se então pelo uso de anestésico em dose suficiente para causar miorelaxamento, para evitar estresse causado pela excessiva manipulação dos animais para observação precisa do sexo desses animais (Figura 5) (LE MAHO et al., 1992). É importante salientar que um avaliador inexperiente pode facilmente confundir machos com fêmeas se a pressão aplicada sobre a cloaca não for suficiente para expor o falo (BUCKLAND; GUY, 2002).

A análise citogenética pode ser utilizada para estudos evolutivos e taxonômicos, o que não foi objetivo deste experimento (GARNERO et al., 2006). Entretanto o material obtido, que se encontra armazenado, poderá ser utilizado oportunamente para esses fins. De acordo com Wójcik e Smalec (2006) os cromossomos sexuais do ganso doméstico (*Anser anser*) encontram-se entre os maiores do conjunto, sendo macrocromossomos; este parâmetro foi utilizado neste experimento para classificar os cromossomos sexuais dos animais avaliados (WÓJCIK; SMALEC, 2007).



Figura 5 - Aspecto da cloaca, independentemente do sexo, antes da anestesia

Para realização da coleta de material para obtenção de cromossomos mitóticos optou-se pela coleta de sangue, devido ao fácil acesso. A escolha do vaso foi baseada na menor manipulação do animal e menor chance de formação de hematomas, sendo a veia metatársica medial escolhida para tal. Segundo Santos e Gunski (2006) pode-se utilizar o bulbo das penas em crescimento e medula óssea, porém não se conseguiu obter penas em crescimento, e seria necessário o arrancamento de algumas penas e a espera de 10-20 dias até as penas jovens crescerem (SANTOS; GUNSKI, 2006). Para a obtenção da medula seria necessário o abate do animal (SANTOS; GUNSKI, 2006).

A técnica de sexagem pela identificação dos cromossomos sexuais foi eficaz, embora dificuldades na realização da técnica tenham sido enfrentadas, como a necessidade do sangue ser fresco ou refrigerado no máximo por 48 horas, a cultura de linfócitos que demora três dias e a qualidade do material obtido, eventualmente com poucas metáfases ou metáfases incompletas. Outro ponto negativo é que os animais precisaram ficar reclusos até a confirmação que o material estava satisfatório para a análise das metáfases.

Existem técnicas mais atuais, como por exemplo a PCR, porém possui custo elevado, tanto em relação aos equipamentos quanto nos materiais utilizados, sendo a maior dificuldade a padronização da técnica em si (VIEIRA et al., 2009). Outro método que poderia ser escolhido para a sexagem dos animais é a dosagem hormonal, tanto sérica quanto fecal. Este método foi realizado em outros estudos que não tiveram foco em determinação sexual, porém poderia

ser aplicado para tal (FRIGERIO et al., 2001; HIRSCHENHAUSER et al., 1999; HIRSCHENHAUSER et al., 2005). Os pontos negativos observados nesta técnica são a disponibilidade de aparelhos para dosagem hormonal, o custo dos materiais utilizados e a sazonalidade reprodutiva, levando a necessidade de várias coletas e avaliações em um indivíduo (HIRSCHENHAUSER et al., 2005).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o método citogenético foi eficiente para a sexagem de gansos, sendo uma alternativa eficaz ao método de observação da cloaca, evitando o procedimento anestésico, mantendo o bem estar dos espécimes.

Declaração de interesse. Os autores relatam nenhum conflito de interesse. Os autores são os únicos responsáveis pelo conteúdo e redação do artigo.

REFERÊNCIAS

BUCKLAND, R.; GUY, G. Goose production. **FAO Animal Production and Health. Paper 154**. [Fonte: <<http://www.fao.org/docrep/005/y4359e/y4359e00.htm#Contents>>]. 2002.

CASTRO, M.S. Análise citogenética e biométrica de exemplares mantidos em cativeiro de espécies de Ramphastidae (Piciformes, aves). 94f. Campinas, SP. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) -

- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. 1997.
- ELLEGREN, H. Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. **Trends in ecology & evolution**, v.15, n.5, p.188-192. 2000.
- FARIA, L.P.; CARRARA, L.A.; RODRIGUES, M. Sexual size dimorphism in henna-capped foli-gleaner *Hylocryptus rectirostris* (Wied) (Aves, Furnariidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.24, p.207-212. 2007.
- FILION, T.; KIDD, S.; AGUIRRE, K. Isolation of *Cryptococcus laurentii* from Canada Goose guano in rural upstate New York. **Mycopathologia**, v.162, n.5, p.363-368. 2006.
- FOX, J.G.; TAYLOR, N.S.; HOWE, S.; TIDD, M.; XU, S.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F. E. *Helicobacter anseris* sp. nov. and *Helicobacter brantae* sp. nov., isolated from feces of resident Canada geese in the greater Boston area. **Applied and environmental microbiology**, v.72, n.7, p.4633-4637. 2006.
- FRANZO, V.S. Ocorrência da doença de Newcastle no Brasil e no mundo. **Ensaios e Ciência**, v.5, n.5, p.81-85. 2007.
- FRIGERIO, D.; MOESTL, E.; KOTRSCHAL K. Excreted Metabolites of Gonadal Steroid Hormones and Corticosterone in Greylag Geese (*Anser anser*) from Hatching to Fledging. **General and comparative endocrinology**, v.124, n.2, p.246-255. 2001.
- GARNERO, A.V.; LEDESMA, M.A.; GUNSKI R.J. Alta homeologia cariotípica na família Tinamidae (Aves: Tinamiformes). **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.14, n.1, p.53-58. 2006.
- GRANDO, A.P. Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual. 107f. São Carlos, SP. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2002.
- HILDEBRANDT, T.; PITRA, C.; SÖMMER, P.; PINKOWSKI M. Sex identification in birds of prey by ultrasonography. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.26, n.3, p.367-376. 1995.
- HIRSCHENHAUSER, K.; MÖSTL, E.; KOTRSCHAL, K. Seasonal Patterns of Sex Steroids Determined from Feces in Different Social Categories of Greylag Geese (*Anser anser*). **General and comparative endocrinology**, v.114, n.1, p.67-79. 1999.
- HIRSCHENHAUSER, K.; KOTRSCHAL, K.; MÖSTL E. Synthesis of measuring steroid metabolites in goose feces. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1046, n.1, p.138-153. 2005.
- ISHII, S.; NAKAMURA, T.; OAWA, S.; KOBAYASHI, A.; SANO, D.; OKABE, S. Water Quality Monitoring and Risk Assessment by Simultaneous Multipathogen Quantification. **Environmental science & technology**, v.48, n.9, p.4744-4749. 2014.
- LE MAHO, Y.; KARMANN, H.; BRIOT, D.; HANDRICH, Y.; ROBIN, J.P.; MIOSKOWSKI, E.; CHEREL, Y.; FARNI, J. Stress in birds due to routine handling and a technique to avoid it. **American Journal of Physiology**, v.263, p.775-781. 1992.
- MCHATTERS, G.R.; SCHAM, R.G. Bird viruses in multiple sclerosis: combination of viruses or Marek's alone?. **Neuroscience letters**, v.188, n.2, p.75-76. 1995.
- MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.T.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental cell research**, v.20, n.3, p.613-616. 1960.
- OLIVEIRA JUNIOR, J.G.; PORTZ, C.; LOUREIRO, B.O.; SCHIAVO, P.A.; FEDULLO, L.P.L.; MAZUR, C.; ANDRADE, C.M. Vírus da doença de Newcastle em aves não vacinadas no Estado do Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, v.33, n.2, p.381-383. 2003.
- PARÉS-CASANOVA, P. An analysis of sexual size dimorphism in goose. **British Poultry Science**, v.55, n.2, p.143-147. 2014.
- PEIXOTO, J.V.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; SANTOS, J.A.D.; SOUZA, G.O.; RIBEIRO, V.T.; TELES, M.A.D.; PEREIRA, T.L. Biópsia testicular de periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalma* Muller, 1776) após sexagem por meio de PCR. **Revista Ceres**, v.55, n.4, p.287-292. 2008.
- POLLOCK, C.G.; OROSZ, S.E. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v.5, n.3, p.441-474. 2002.
- RASO, T.F; WERTHER, K. Sexagem cirúrgica em aves silvestres. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.2, p.187-192. 2004.
- RICHNER, H. Avian Laparoscopy as a Field Technique for Sexing Birds and an Assessment of Its Effects on Wild Birds (Laparoscopia en el Campo como Técnica para Determinar el Sexo de Aves). **Journal of Field Ornithology**, v.60, n.2, p.137-142. 1989.
- SANTOS, L.P.; GUNSKI, R.J. Revisão de dados citogenéticos sobre a avifauna brasileira. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.14, n.1, p.35-45. 2006.

TSIODRAS, S.; KELESIDIS, T.; KELESIDIS, I.; BAUCHINGER, U.; FALAGAS, M.E. Human infections associated with wild birds. **Journal of Infection**, v.56, n.2, p.83-98. 2008.

VIEIRA, J.N.; COELHO, E.G.A.; OLIVEIRA, D.A.A. Sexagem molecular em aves silvestres. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.2, p.66-70. 2009.

WÓJCIK, E.; SMALEC, E. Description of the *Anser anser* Goose Karyotype. **Folia biológica**, v.55, n.1-2, p.35-40. 2007.