

Biópsia testicular de periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalma* Muller, 1776) após sexagem por meio de PCR

Juliano Vogas Peixoto¹
Tarcízio Antônio Rêgo de Paula¹
Sérgio Luís Pinto da Matta²
Jorge Abdala Dergam dos Santos³
Gisele Oliveira de Souza²
Vinícius Tolentino Ribeiro¹
Monique Aline das Dores Teles¹
Tiago Leão Pereira²

RESUMO

O acesso ao tecido testicular para estudos sobre a morfofisiologia em aves pode ser realizado por meio da eutanásia do animal ou por biópsia testicular incisional. A biópsia testicular incisional, além de tornar desnecessário o sacrifício do animal, é um procedimento conservativo da capacidade reprodutiva, que permite traçar parâmetros de grande importância para a reprodução, além de diagnósticos de alterações na produção de espermatozoides, como oligospermia ou azospermia. No entanto, em aves monomórficas essas pesquisas apresentam a dificuldade extra da diferenciação externa do sexo pré-cirúrgica. O presente trabalho objetivou averiguar a viabilidade e confiança do teste de sexagem por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) associada à técnica de biópsia testicular incisional, através de celioscopia, em periquitão-maracanã (*A. leucophthalma*) com o intuito de acessar tecido testicular suficiente para o desenvolvimento de pesquisas com morfofisiologia reprodutiva com sobrevida do animal. Foram utilizados 14 periquitões-maracanãs machos, previamente sexados pela técnica de PCR. Esses animais tiveram seu sexo confirmado cirurgicamente pelo processo de celioscopia e sofreram biópsia testicular incisional conduzida ao longo das quatro estações climáticas do ano, suprimindo adequadamente a necessidade de material para verificação histológica da dinâmica da espermatogênese em *A. leucophthalma*.

Palavras-chave: *Aratinga leucophthalma*, biópsia testicular, PCR

ABSTRACT

Testicular biopsy of white-eyed parakeet (*Aratinga leucophthalma* Muller, 1776) after sexing test by PCR

The access to testicular tissue for studies of morphophysiology in birds can be accomplished through the euthanasia of the animals or by incisional testicular biopsy. Incisional testicular biopsy makes animal sacrifice unnecessary and is a procedure that preserves the reproductive capacity and allows to establish parameters of great importance for the reproduction and also to diagnose changes in sperm production, such as oligospermia or azospermia. However in monomorphic birds, these studies present the extra difficulty of pre-surgical sex differentiation. The present work aimed to analyze the viability and the accuracy of sex test using the polymerase chain reaction (PCR) associated with

Recebido para publicação em fevereiro de 2007 e aprovado em junho de 2008.

¹ Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa. 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: vetjuliano@yahoo.com.br

² Departamento de Biologia Animal. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

³ Departamento de Biologia Geral. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG

incisional testicular biopsy using celioscopy, in white-eyed parakeet (*A. leucophthalma*) to access enough testicular tissue for the development of researches on reproductive morphophysiology. Fourteen male white-eyed parakeets were tested for sex determination by PCR technique and used in the experiment. These animals had their sex confirmed surgically by celioscopic process and underwent incisional testicular biopsy along the four seasons of the year, providing adequate material for histological verification of spermatogenesis dynamics in *A. leucophthalma*.

Key words: *Aratinga leucophthalma*, testicular biopsy, PCR

INTRODUÇÃO

As aves, em sua maioria, caracterizam-se morfológicamente pela exuberância de suas cores e pelo formato das penas, principalmente do macho, que utiliza esta característica como um atrativo para as fêmeas no período reprodutivo. Porém, algumas espécies não apresentam um marcado dimorfismo sexual, seja esse temporário, como observado durante a fase jovem da vida de alguns passeriformes, ou definitivo, como na maioria dos psitacídeos (Collar, 1997; Sick, 1997). A *Aratinga leucophthalma* enquadra-se dentro do último grupo, apresentando cabeça em forma oval, cor predominantemente verde, com algumas penas vermelhas nas faces laterais da cabeça, do pescoço, das asas e do bico de cor clara, características essas comuns em ambos os sexos (Sick, 1997; Ruschi, 1979). Esta ave não se encontra na lista de animais ameaçados de extinção (IBAMA, 2006; CITES, 2006).

A reprodução em cativeiro de aves silvestres, em especial as que se encontram em risco de extinção, é essencial para a formação de um plantel que possa vir a ser utilizado em programas de repovoamento. Dessa forma, a determinação do sexo em aves monomórficas é fundamental para o sucesso reprodutivo. Várias metodologias podem ser empregadas na diferenciação sexual de aves monomórficas, dentre elas celioscopia, análise citogenética, análise de hormônios, diagnóstico por imagem e análise de DNA.

Um dos métodos de sexagem de aves mais confiáveis é o de identificação direta da gônada através de celioscopia, porém limitado em aves jovens ou que apresentam grande acúmulo de gordura intracelomática (Raso & Werther, 2004). Essa técnica incorre ainda em riscos, como hemorragias, acidente anestésico, infecções e formação de enfisema subcutâneo pós-cirúrgico (Taylor, 1994).

A análise citogenética do sexo é baseada na cariotipagem e identificação do cromossomo W, que é restrito às fêmeas das aves. Nessa técnica, é necessário identificar os cromossomos na fase metafásica, os quais são contados, medidos e morfológicamente analisados (Giannoni *et al.*, 1986). Essa é uma técnica precisa, porém

trabalhosa e demorada, podendo levar até 20 dias para a obtenção dos resultados (Giannoni *et al.*, 1986; Lucca & Rocha, 1992).

A sexagem de aves por análise de hormônios baseia-se na identificação da relação estrógeno x testosterona, presente na circulação sanguínea ou nas fezes. Em ambos os casos há limitação da técnica às aves adultas em período reprodutivo. Essa técnica apresenta ainda resultados não totalmente confiáveis, embora a análise fecal apresente a grande vantagem de não ser invasiva, não submetendo, dessa forma, as aves ao estresse de contenção (Dias, 2003).

As técnicas de sexagem por imagem em aves são ainda limitadas e pouco precisas. O uso da ultrassonografia transcloacal permite a identificação do oviduto esquerdo em aves de rapina e pinguins adultos (Hildebrandt *et al.*, 1995; Hildebrandt *et al.*, 1996). Grando (2002) sugere a sexagem com a utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear em *A. leucophthalma*, embora concluindo pela eficiência da técnica, seus resultados foram limitados somente para a observação de gônadas bem desenvolvidas em animais adultos. Esta técnica incorre ainda em riscos de acidentes anestésicos e limita-se a equipamentos caros e não portáteis.

A sexagem por meio do DNA baseia-se na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), uma técnica extremamente confiável e pouco invasiva. Essa técnica utiliza *primers* de dois genes conservados CHD: o CHD-W, que localiza-se no cromossomo W e, portanto, é restrito às fêmeas, e o CHD-Z, presente em machos e fêmeas. Os *primers* utilizados amplificam uma banda nos machos ZZ e duas bandas nas fêmeas ZW, as quais apresentam diferentes comprimentos pela presença de íntrons (Griffiths *et al.*, 1998). Assim, essa técnica consiste na extração e amplificação de segmentos específicos do DNA da amostra, correspondentes aos genes CHD-W da Fêmea e CHD-Z do macho e da fêmea, estes são então depositados sobre colunas de gel polimerizado de poliácridamida e submetidos à eletroforese de 80 v, o que separa especificamente esses fragmentos em bandas identificáveis (Griffiths *et al.*, 1998).

Segundo vários autores, um ciclo sazonal reprodutivo é reportado em várias espécies de aves, mesmo aquelas tropicais (Immelmann, 1971; Ruschi, 1979; Sick, 1997). Em reflexo a essa sazonalidade reprodutiva é observado um ciclo testicular, bastante evidente em *A. leucophthalma* (Peixoto, 2006). Estudos pertinentes a esse ciclo testicular são escassos, porém de grande importância no desenvolvimento de programas em reprodução nesses animais. Para os estudos básicos sobre a anatomia e fisiologia testicular, o acesso ao tecido testicular pode ocorrer por meio da eutanásia do animal ou por biópsia testicular incisional. A biópsia testicular incisional, além de tornar desnecessário o sacrifício do animal, é um procedimento conservativo da capacidade reprodutiva. Assim, a biópsia testicular incisional permite traçar parâmetros de grande importância para a reprodução, além de diagnósticos de alterações na produção de espermatozoides, como oligospermia ou azospermia (Crosta *et al.*, 2002; Guião-Leite & Paula, 2003; Bittencourt *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2006; Guião-Leite *et al.*, 2006; Mascarenhas *et al.*, 2006).

O presente trabalho objetivou a descrição da técnica de biópsia testicular incisional através de celioscopia em periquitão-maracanã (*A. leucophthalma*) ao longo das estações climáticas do ano, com o intuito de obter tecido testicular suficiente para o desenvolvimento de pesquisas em morfofisiologia reprodutiva com sobrevivência do animal. Objetivou ainda conferir a viabilidade e confiança do teste de sexagem por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 36 periquitões-maracanãs (*A. leucophthalma*), com diversas idades, alocados no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV). Os animais foram mantidos em recinto comunitário, delimitado por tela de arame, com dimensões de 4,76 m de comprimento, 2,50 m de largura e 2,50 m de altura. Todas as aves foram identificadas com anilhas de metal numeradas ao redor do tarsometatarso direito.

Os animais receberam alimentação à base de mistura de sementes como girassol, amendoim, milho e lentilhas, frutas diversas, além de água *ad libitum*. Por se tratar de animais pertencentes à fauna brasileira, o experimento foi conduzido com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), licença nº 447/05-NUFAS/MG, processo nº 02015.016298/05-59. O presente projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 84/2005).

Coleta de sangue e extração de DNA para sexagem por PCR

Todos os animais foram sexados por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR). Para coleta de material e amplificação do DNA, cada ave foi contida fisicamente com auxílio de uma toalha, com posterior exposição do membro pélvico direito. Após anti-sepsia local, foi feita uma secção na extremidade distal da unha do dedo três para coleta de duas gotas de sangue, que foram colocadas em tubos ependorf contendo 500 µL de etanol absoluto. O material foi armazenado em freezer a -60 °C até o momento das análises. Após a coleta do sangue, foi realizada hemostasia no local com aplicação tópica de cristais de nitrato de prata.

As extrações do DNA foram processadas utilizando-se o detergente CTAB (brometo de cetiltrimetil amônia) a partir de modificações do protocolo de Boyce *et al.* (1989) no Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa. Um pequeno fragmento do sangue já coagulado foi colocado em um tubo ependorf contendo 500 µL de CTAB (cada 200 mL da solução de CTAB contém 160 mL de H₂O; 16,36 g de NaCl; 400 mL de b-mercapto-etanol; 20 mL de solução a 1M de Tris-HCl em pH 8,0; 8 mL de solução a 0,5 M de Na₂EDTA em pH 8,0; e 4 g de CTAB) e macerado com auxílio de pistilo. Essa mistura foi posteriormente incubada em banho-maria *Fanem* a 60 °C durante uma hora, sendo a suspensão misturada com um vórtex em intervalos de 20 minutos para uma ação mais eficiente do detergente na ruptura das membranas celulares.

Após esse período, o material foi centrifugado a 14.000 rotações por minuto por dois minutos em centrífuga *Eppendorf*[®], e o sobrenadante, cerca de 450 µL, foi transferido com o auxílio de uma pipeta para outros tubos contendo 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (1:24). Essa solução foi homogeneizada manualmente e posteriormente, centrifugada a 13.600 rotações por minuto, durante 15 minutos, para precipitar as proteínas na interface entre o CTAB e o álcool isoamílico. Após esse momento, ocorre a formação de duas fases, separadas por uma interface esbranquiçada semelhante a uma película. O sobrenadante dessa solução foi transferido para um terceiro conjunto de tubos contendo 250 µL de propanol resfriado (-20 °C), homogeneizado e mantido por um período mínimo de 30 minutos em geladeira (4 °C). Essa etapa permitia estocagem até o dia seguinte.

Passado esse período, os tubos foram centrifugados a 13600 rotações por minuto, por 30 minutos, para que o DNA precipite no fundo do tubo, o qual se adere ao tubo e pode ser visualizado como um “pellet” após duas lavagens com etanol 75 e 100%.

Finalmente, o material foi secado à temperatura ambiente e depois ressuspendido em Tris-HCl- EDTA pH 8,0 (filtrado e estéril). O material foi estocado a -20°C até o momento da amplificação.

Amplificação do DNA

Para cada amostra, foi preparada uma solução contendo 14,3 μL de água milli-Q, 2 μL de tampão da Taq polimerase 10x, 0,3 μL de MgCl_2 , 0,2 μL de dNTPs, 0,2 μL de Taq polimerase, 1 μL de primer P8 (5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3') e de P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') a 10 mM e 1 μL de DNA do animal a ser sexado. As reações foram executadas num termociclador *MJ Research*[®] (PTC100), onde passaram por 30 ciclos de desnaturação a 95°C , durante 30 segundos, seguido por um ciclo de anelamento a 47°C por 30 segundos, e um ciclo de extensão a 72°C , por 30 segundos.

Eletroforese e revelação do gel

Após a amplificação do DNA, as amostras foram carregadas em géis (13 x 17 cm) de poliacrilamida 6% (14,63 mL de água ultrapura; 6,0 mL de bisacrilamida 30%; 5 mL TEB 5x; 12,5 μL TEMED; e 250 μL PSA 10%) feitos utilizando-se duas placas de vidro. Uma vez polimerizados, os géis foram montados em cubas verticais contendo TEB 1X. O gel foi carregado com 6 μL de amostra adicionados de 4 μL de tampão de amostra (Azul de Bromofenol 0,12% e Xileno Cianol 0,12%, dissolvidos em TEB 5x), carregados em cada canaleta e submetidos a corridas de aproximadamente quatro horas, a uma voltagem de 80V, para separação de bandas específicas de fragmentos de DNA por eletroforese.

Após esse período, o gel foi fixado em solução contendo 10% de etanol absoluto e 0,5% de ácido acético por um período de 10 minutos. Posteriormente, foi impregnado com solução a base de AgNO_3 0,2%, durante 10 minutos, lavado em água deionizada por 30 segundos e revelado em solução a 3% de NaOH e 0,6% de formol. Para interromper a revelação, utilizou-se o fixador supracitado por aproximadamente 30 segundos. Finalmente foi realizada a desidratação do gel em álcool 50% e feito a montagem sobre placa de vidro recoberta com lâmina de plástico, permanecendo à temperatura ambiente até que secasse totalmente. Em seguida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta.

Biópsia testicular

Os procedimentos de biópsia testicular foram conduzidos nas seguintes datas: 06/02/2006, 11/05/2006, 16/08/2006 e 07/11/2006, correspondendo ao período intermediário das estações de verão, outono, inverno e primavera, respectivamente.

Quatorze dos animais sexados como machos foram distribuídos em quatro grupos de animais adultos, de forma aleatória para o procedimento de biópsia, nas épocas correspondentes à primavera (n = 4), verão (n = 4), outono (n = 3) e inverno (n = 3). Essas aves tiveram o testículo esquerdo biopsiado por meio de celioscopia. Para tal, após jejum de quatro a seis horas, os animais foram submetidos à anestesia inalatória com o uso de isoflurano, através de circuito aberto de oxigênio com o uso de máscaras específicas. Uma vez anestesiado, o animal foi pesado em balança digital e acomodado sobre bolsa térmica (40°C), em decúbito lateral direito. As asas foram imobilizadas dorsalmente, e o membro pélvico esquerdo tracionado cranialmente, por meio de fita adesiva. Foi feita uma incisão na região formada por um triângulo virtual, tendo como vértices o fêmur esquerdo, o púbis e a última costela.

Para preparo do campo cirúrgico foram removidas as penas do local e procedida anti-sepsia com iodo polivinil pirrolidona. Posteriormente, foi realizada uma pequena incisão de pele, e com uma tesoura de ponta fina a musculatura abdominal foi divulsionada para acesso à cavidade celomática. Para visualização interna, foram utilizados um otoscópio veterinário Welch-Allyn[®] com lâmpada halogênica produtora de luz fria e uma espécula de polipropileno de 4 mm de diâmetro, devidamente esterilizada em solução de Germekil[®] e lavada com solução fisiológica. A partir da incisão, a espécula foi introduzida através do saco aéreo abdominal caudal, visualizando a gônada esquerda.

A biópsia foi realizada com uma pinça própria, introduzida paralela à espécula, coletando um pequeno fragmento testicular perpendicularmente ao eixo longitudinal do testículo esquerdo e em sua extremidade cranial, evitando possíveis lesões em epidídimo e ductos deferentes. Foram realizados dois planos de sutura: na musculatura, com pontos simples separados; e na pele, com ponto intradérmico contínuo com extremidades embutidas, utilizando fio absorvível sintético poliglactina 910 (Vicril[®] 2,0 – Ethicon).

O procedimento pós-cirúrgico envolveu tratamento local e aplicação de 15 mg/kg de Enrofloxacina 2,5% via intramuscular, como agente antibiótico, uma vez ao dia, durante três dias, e de 4 mg/kg de Flunixin meglumine via intramuscular, como agente antiinflamatório, uma vez ao dia, durante três dias.

Após a coleta, os fragmentos testiculares foram imersos imediatamente em solução fixadora Karnovsky (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 4%) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 à temperatura ambiente, sendo, posteriormente, encaminhados para o processamento histológico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dado importante para o estudo da dinâmica populacional é o conhecimento do número de pares de aves potencialmente reprodutoras em uma população, que pode ser avaliado pelo conhecimento da razão macho/fêmea. Isso é crítico em aves ameaçadas de extinção e, principalmente, naquelas que assumem comportamento monogâmico, uma vez que o disparate na razão entre sexos pode afetar drasticamente o tamanho da próxima geração. Se um sexo é mais freqüente que outro, isso implica que o número de casais estará limitado pelo sexo com menor número de indivíduos (Miyaki et al., 1998).

A única estimativa da razão sexual em população de psitacídeos neotropicais de vida livre foi realizada por Guedes apud Miyaki et al. (1998), ao longo de cinco anos de coletas de amostras de sangue de filhotes de *Anodorhynchus hyacinthinus* no Pantanal (BR), no período em que ele encontrou uma razão próxima de 1:1. No presente trabalho, com animais recebidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres da UFV, foi encontrada uma razão macho/fêmea de *A. leucophthalma* de 1,25:1: ou seja, foram sexados 20 machos e 16 fêmeas.

Neste trabalho foi usada a técnica de sexagem baseada na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), conforme descrito por Griffiths et al. (1998), utilizando primers comerciais de dois genes conservados CHD (cromo-helicases ligantes de DNA): P8(5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') e P2(5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'). O gene CHD-W localiza-se no cromossomo W e, portanto, é restrito às fêmeas, e o CHD-Z está presente em machos e fêmeas. Esta técnica consagrou-se ao permitir a sexagem do último exemplar de ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*) em vida livre a partir de penas encontradas no ambiente da ave (Griffiths & Tiwari, 1995). Conforme o encontrado por Miyaki et al. (1998) e Griffiths et al. (1996), os primers utilizados amplificaram uma banda nos machos ZZ e duas bandas nas fêmeas ZW, as quais apresentam diferente comprimento pela presença de íntrons, conferindo reprodutibilidade e confiabilidade desta técnica na sexagem de *A. leucophthalma* (Figura 1).

A determinação do sexo em aves monomórficas é ainda fundamental para o sucesso reprodutivo de espécies silvestres mantidas em cativeiro. A sexagem baseada no método de PCR é de grande valia para os projetos de reprodução em cativeiro, uma vez que é rápida, segura e pouco invasiva, conferindo certeza do correto pareamento das aves, já que muitas chegam a formar e se comportar como casal, mesmo sendo do mesmo sexo.

Esta técnica é de grande importância, ou mesmo revolucionária para as práticas de reprodução assistida em aves monomórficas. Dessa forma, 14 periquitões-maracanãs machos, previamente sexados pela técnica de PCR, tiveram seu sexo confirmado cirurgicamente pelo processo de

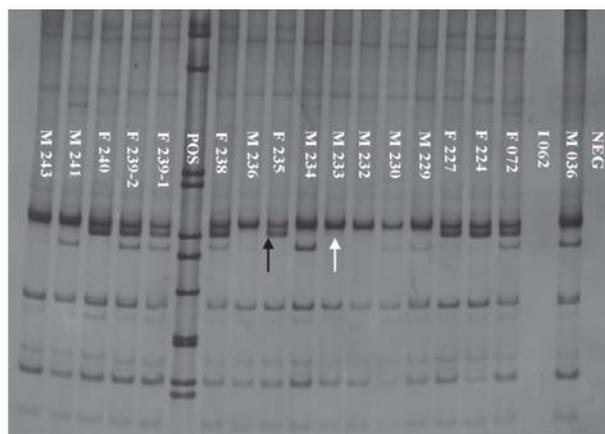


Figura 1 - Gel de poliacrilamida demonstrando padrão de 1 banda (seta branca) para o sexo masculino (M) e 2 bandas (seta preta) para o sexo feminino (F), seguidos do número de identificação de parte dos indivíduos de *A. leucophthalma* utilizados no trabalho. NEG – controle negativo da eletroforese, POS – controle positivo da eletroforese, I – sexo não identificado, devido ausência de DNA.

celioscopia e biópsia testicular. A biópsia testicular, apesar de ser excelente método de acesso a material para pesquisa, é pouco utilizada devido ao receio de ocasionar efeitos deletérios na produção espermática, direta ou indiretamente, pela produção de anticorpos antiespermatozoides. No entanto, estudos recentes dos efeitos da biópsia testicular em mamíferos e aves demonstraram que a redução da produção de espermatozoides ou não ocorre, ou é apenas transitória, não interferindo na capacidade reprodutiva dos animais (Attia et al., 2000; Crosta et al., 2002; Crosta et al., 2003; Mascarenhas et al., 2006). Por essa razão, esse método de coleta de material poderia ser utilizado como método de eleição para o estudo da fisiologia e patologias reprodutivas em animais domésticos e selvagens, uma vez que fornece material suficiente para análise histológica (Lopate et al., 1989; Threlfall & Lopate, 1993; Attia et al., 2000; Crosta et al., 2002; Crosta et al., 2003; Guião-Leite & Paula, 2003; Bittencourt et al., 2004; Azevedo et al., 2006; Mascarenhas et al., 2006).

A biópsia testicular também se destaca no cenário das pesquisas que envolvem conservação de animais silvestres, uma vez que não só preserva a vida do animal como também a capacidade de produção de células germinativas viáveis. Os estudos acerca do material testicular oriundo da biópsia possuem ainda grande potencial de informação para o desenvolvimento de protocolos de reprodução assistida que poderão, de maneira muito direta, contribuir decisivamente na conservação destas espécies.

Segundo Crosta et al. (2002), a biópsia testicular deveria ser limitada ao período de repouso sexual, quando os testículos encontram-se diminuídos de tamanho e menos vascularizados. Porém, essa restrição ao período de quiescência testicular restringiria as pesquisas envolvendo a dinâmica da espermatogênese a um único período do

ano. No presente trabalho, foi possível realizar a biópsia testicular ao longo das quatro estações climáticas.

As biópsias testiculares efetuadas ao longo das quatro estações climáticas do ano permitiram a verificação histológica da dinâmica da espermatogênese em *A. leucophthalma*, com resultados inéditos comprovando marcada reprodução sazonal nesta espécie. Tais informações serão utilizadas como base para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida em cativeiro, não só nesta espécie como em outras de psitacídeos, de forma especial naquelas em risco de extinção.

CONCLUSÕES

A técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) demonstrou 100% de confiabilidade quanto aos resultados da sexagem de machos de *A. leucophthalma*.

A biópsia é um excelente método de coleta de tecido testicular *in vivo*, podendo ser realizada nas quatro estações climáticas do ano, provendo material suficiente para pesquisas sobre a morfofisiologia testicular em *A. leucophthalma*.

A associação das duas técnicas revelou ser excelente combinação para os estudos relacionados à reprodução assistida, principalmente aqueles envolvendo aves sem marcado dimorfismo sexual.

REFERÊNCIAS

- Attia KA, Zaki AA, Eilts BE, Paccamont DL, Hosgood G, Dietrich MA, Horohov DW, Blowin DC (2000) Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididymal aspiration in dogs. *Theriogenology*, 53:1355-1363.
- Azevedo MHF, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca CC, Neves MTD (2006) Morfometria testicular e o túbulo seminífero da onça pintada (*Panthera onca*). *Revista Ceres*, 53:374-381.
- Bittencourt VL, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca SS, Neves MTD, Costa MEL, Malta MCC, Coelho CM, Bastos JAB (2004) Evaluation of seminiferous epithelium cell population and indicative index of sperm production by testicular biopsy in adult maned wolf (*Crysocyon brachyurus*, Illiger, 1811). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 28:108 – 113.
- Boyce TM, Zwick ME, Aquadro CF (1989) Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, 123:825-836.
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/resources/species.html>>. Acesso em: 09 dezembro 2006.
- Collar NJ (1997) Family Psittacidae (Parrots). In: Del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J Handbook of the birds of the world. Barcelona, Lynx Edicions. v.4, p.280-447.
- Crosta L, Gerlach H, Bürkle HM (2002) Endoscopic testicular biopsy technique in psittaciformes. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 16:106-110.
- Crosta L, Gerlach H, Bürkle HM, Timossi L (2003) Physiology, diagnosis, and diseases of the avian reproductive tract. *The Veterinary Clinics Exotic Animal Practice*, 6:57-83.
- Dias EA (2003) Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunensaio (RIE) de esteróides sexuais e por reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir de excretas cloacais. Dissertação de mestrado. São Paulo, Universidade de São Paulo. 109 p.
- Giannoni ML, Giannoni MA, Ferrari I (1986) Citogenética aplicada às aves: técnicas para obtenção de metafases. Piracicaba, FEALQ. 52p.
- Grando AP (2002) Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual. Tese de mestrado. São Carlos, Universidade de São Paulo. 89p.
- Griffiths R, Daan S, Dijkstra C (1996) Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings: Biological Sciences*, 263:1251-1256
- Griffiths R, Doublé MC, Orr K, Dawson RJG (1998) A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7:1071-1075.
- Griffiths R & Tiwari B (1995) Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature*, 375:454
- Guião-Leite FL & Paula TAR (2003) Intrisec yield of spermatogenesis, Sertoli cell index and daily sperm production in cougar (*Puma concolor*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 27:1-21.
- Guião-Leite FL, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca CS, Neves MTD, Barros JBG (2006) Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). *Animal Reproduction Science*, 91:307-316.
- Hildebrandt T, Göritz F, Bosch H, Seidel B, Pitra C (1996) Ultrasonographic sexing and reproductive assessment of penguins. *Penguin Conservation*, 9:6-12.
- Hildebrandt T, Pitra C, Sömmer P, Pinowski M (1995) Sex identification in birds of prey by ultrasonography. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 26:367-376.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm/>>. Acesso em: 09 dezembro 2006.
- Immelmann K (1971) Ecological aspects of periodic reproduction. In: Farner DS & King JR (Eds.) *Avian biology*. New York, Academic Press v. 1, p. 341-389.
- Lopate C, Threlfall WR, Rosol TJ (1989) Histopatologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. *Theriogenology*, 32:585-602.
- Lucca EJ & Rocha GT (1992) Citogenética de aves. *Boletim do Museu Paranaense Emílio Goeldi – Série Zoologia*, 8:33-68.
- Mascarenhas RM, Paula TAR, Carreta Jr M, Ribeiro ECS, Borboleta LR, Matta, SLP (2006) Efeitos da biópsia incisional testicular sobre o rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de Sertoli em cães. *Revista Ceres*, 53:100-105.
- Miyaki CY, Griffiths R, Orr K, Nahum LA, Pereira SL, Wajntal A (1998) Sex identification of parrots, toucans, and curassows by PCR: perspectives for wild and captive population studies. *Zoo Biology*, 17:415-423.
- Peixoto JV (2006) Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalma* Muller, 1776) adulto, mantido em cativeiro, nas diferentes estações do ano. Dissertação de mestrado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 53 p.
- Raso TF & Werther K (2004) Sexagem cirúrgica em aves silvestres. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 56:187-192.
- Ruschi A (1979) *Aves do Brasil*. São Paulo, Rios. 335p.
- Sick H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro, Nova Fronteira. 912 p.
- Taylor M (1994) Endoscopic examination and biopsy techniques. In: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR (Eds.) *Avian medicine: principles and application*. Florida, Wingers. p. 327-354.
- Threlfall WR & Lopate C (1993) Testicular biopsy. In: Mc Kinnon AO & Voss JL (Eds.) *Equine Reproduction*. Philadelphia, Lea & Febiger. p. 943-949.