

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

IDENTIFICAÇÃO DO SEXO DE PSITACÍDEOS (*Amazona
aestiva*) POR MEIO DA AVALIAÇÃO GONADAL, UTILIZANDO
A TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (TC).

RICARDO COELHO LEHMKUHL

Botucatu – SP
Abril 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

IDENTIFICAÇÃO DO SEXO DE PSITACÍDEOS (*Amazona
aestiva*) POR MEIO DA AVALIAÇÃO GONADAL, UTILIZANDO
A TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (TC)

RICARDO COELHO LEHMKUHL

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Vulcano
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto
Teixeira

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Lehmkuhl, Ricardo Coelho.

Identificação do sexo de psitacídeos (*Amazona aestiva*) por meio da avaliação gonadal, utilizando a tomografia computadorizada (TC) / Ricardo Coelho Lehmkuhl. – Botucatu, 2010.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Vulcano

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Assunto CAPES: 50500007

1. Papagaio (Ave) - Sexagem. 2. Gonadas. 3. Tomografia computadorizada.

Palavras-chave: Gônadas; Papagaios; Psitacídeos; Sexagem; Tomografia.

Nome do Autor: Ricardo Coelho Lehmkuhl

Título: IDENTIFICAÇÃO DO SEXO DE PSITACÍDEOS (*Amazona aestiva*) POR MEIO DA AVALIAÇÃO GONADAL, UTILIZANDO A TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (TC).

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos Vulcano
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ-UNESP – Botucatu

Profª Drª Vânia Maria de Vasconcelos Machado
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ-UNESP – Botucatu

Profª Drª Sheila Canavese Rahal
Membro
Departamento de Anestesiologia e Cirurgia Veterinária
FMVZ-UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Masao Iwasaki
Membro
Diretor administrativo da Fundação Parque Zoológico de São Paulo – SP
Professor Titular do Departamento de Cirurgia – FMVZ – USP

Dr. João Batista da Cruz
Membro
Diretor Técnico-Científico da Fundação Parque Zoológico de São Paulo - SP

Data da Defesa: 30 de Abril de 2010.

FELIZ AQUELE QUE TRANSFERE O QUE SABE E APRENDE O
QUE ENSINA (CORA CORALINA)

DEDICATÓRIA

À minha esposa **Zara Bortolini** pela companhia, estímulo, Carinho e
compreensão.

Aos meus pais, Jonas e Marlene por não medirem esforços ao meu
crescimento pessoal e profissional e por apoiarem todas minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Luiz Carlos Vulcano, que permitiu a realização deste doutorado, confiando e proporcionando ensinamentos, apoio, amizade e principalmente oportunizando um melhor conhecimento da área do diagnóstico por imagem. Meu muito obrigado.

Ao professor Dr. Carlos Roberto Teixeira, pela amizade e co-orientação bem como a oportunidade de conhecimento da Medicina de Animais Silvestres, na qual é um grande entusiasta.

As Professoras. Dra. Vânia Maria de Vasconcelos Machado e Dra. Maria Jaqueline Mamprim, que sem perceberem, muito me auxiliaram nos momentos de conversa nos corredores do Setor de Diagnóstico por Imagem.

A Professora Dra. Sheila Canevese Rahal, pelos ensinamentos na área de Cirurgia Veterinária e pelo seu entusiasmo, na área de Clínica Cirúrgica de Animais Silvestres.

Ao colega de doutorado e de Instituição (UNICENTRO), futuro Dr. Marcos Vinicius Tranquilim, pela amizade e ensinamentos na área de Animais Silvestres.

Aos colegas da pós-graduação pelo apoio, em especial a Mariana Ferreira de Almeida e Felipe Geller, pelo auxílio durante o experimento, assim como as Residentes em Diagnóstico Por Imagem, Danuta Pulz Doiche, Lídice Campos e Viviam Babicsak, pelos ensinamentos em seus laudos.

A Professora Doutora Giuliana Gelbcke Kasecker Botelho (UNICENTRO), pela amizade e auxílio nas traduções, assim como ao mestrando em Diagnóstico por Imagem, Thiago Muller, pelo auxílio nas traduções necessárias, para esta tese e trabalhos enviados.

Ao Técnico em Diagnóstico por Imagem, Heraldo Catalan Rosa, pois sem ele a observação e a aquisição das imagens não teriam qualidade para avaliação e aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Marcos Antonio Fumes Pelicci, Benedito José Alho Favan e Wilma Maria de Castro, pela companhia neste período.

Aos Diretores dos Zoológicos de São Paulo, de Sorocaba e ao Parque Ecológico do Tiête, pela cessão dos animais utilizados neste experimento.

À FAPESP pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Peso das aves utilizadas no experimento.....	24
Gráfico 2 -	Tempo de recuperação anestésica observada individualmente durante o protocolo de tomografia computadorizada, nas aves do experimento.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Animais encaminhados ao Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Selvagens (CEMPAS) – FMVZ/UNESP - Botucatu, sob autorização 15818-1/SISBIO.....	21
-----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Exemplares do Gênero <i>Amazona aestiva</i> , utilizados para fins de sexagem por tomografia computadorizada (TC).....	22
Figura 2 -	Aparelho de tomografia computadorizada helicoidal do Setor de Diagnóstico Por Imagem da FMVZ/UNESP – Botucatu.....	23
Figura 3 -	Caixas plásticas utilizadas para transporte das aves até o Setor de Diagnóstico Por Imagem da FMVZ/UNESP – Botucatu.....	25
Figura 4 -	Aplicação Intramuscular no músculo peitoral, de anestesia para procedimento de tomografia, observa-se a contenção física com uso de luva de couro.....	26
Figura 5 -	Realização do procedimento tomográfico observa-se o paciente em decúbito dorsal.....	26
Figura 6 -	<i>Scout</i> realizado em <i>Amazona aestiva</i> , demonstrando área de corte total.....	27
Figura 7 -	Tela da <i>Workstation</i> aonde se visualiza o <i>scout</i> (A) e o corte de número 11 de visualização da gônada, no caso ovário (B).....	28
Figura 8 -	Fantoma com sensor de dosimetria em seu interior.....	29
Figura 9 -	<i>Scout</i> demonstrando o posicionamento do sensor dentro do fantoma.....	30
Figura 10-	Imagem tomográfica de <i>scout</i> , mostrando área total de corte, 75mm (A) e 23mm (B) com a mesma técnica de mA e kVp para a obtenção de imagem.....	34
Figura 11 -	Observa-se as gônadas masculinas (testículos) em corte axial (Setas grossas).....	34
Figura 12-	Corte axial realizado 3mm caudal à figura anterior, demonstrando as gônadas masculinas (setas brancas) ventrais aos rins (dorsais).....	35
Figura 13 -	Visibilização da gônada feminina (ovário) em corte axial (círculo branco).....	35
Figura 14 -	Corte axial realizado 2mm caudal à figura anterior, demonstrando a gônada feminina (circulo branco) ventral aos rins (setas).....	36

Figura 15 -	Imagem tomográfica de avaliação gonadal de macho em corte axial (A), em reconstrução sagital (B), sendo que dentro do círculo observamos os testículos e na seta branca o Rim e reconstrução dorsal (C).....	36
Figura 16 -	Imagem tomográfica de avaliação gonadal de fêmea em corte axial (A) e em reconstrução sagital (B) e reconstrução dorsal (C), dentro do círculo observamos o ovário.....	37
Figura 17 -	Imagem de corte axial demonstrando os testículos em corte de seu maior diâmetro, apresentando 5mm em ambas as gônadas.....	38
Figura 18 -	Imagem de corte axial demonstrando o ovário em corte axial, apresentando 24 mm de diâmetro ovariano.....	38
Figura 19 -	Visualização gonadal observa-se os testículos (T) de 5mm de comprimento, Lobo cranial do rim (Cr), lobo médio (M) e lobo caudal (Cd).....	39
Figura 20 -	Visualização gonadal observa-se o ovário (Ov) de 12mm de comprimento, Lobo cranial do rim (Cr), lobo médio (M) e lobo caudal (Cd).....	40

ABREVIATÖES

cc – Centímetro cúbico

CCD – *Charge Couple Device*

CEMPAS – Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Selvagens

CETAS – centros de triagem de animais silvestres

CHD – *chromo-helicase-DNA-binding*

cm – Centímetros

DICOM – *Digital Imaging and Communications in Medicine*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EMI – Electric and Musical Industries (Antiga Unidade Housnfield)

FPZSP – Fundação Parque Zoológico de São Paulo

g – Gramas

HU – Unidades Housnfield

IM – Intramuscular

IV – Intravenoso

Kg – Kilograma

kVp – Kilovoltagem

mA – Miliampére

mg – Miligrama

mGy – Unidade de radiação Miligray

MHZ – Megahertz

mL – Mililitro

mm – Milímetro

MPR – Imagens Multiplanares

PBS – Tampão Fosfato Salino

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PET – Parque Ecológico Tiête

RM – Ressonância Magnética

TC – Tomografia Computadorizada

TRMN – Tomografia por Ressonância Magnética Nuclear

ZW – Cromossomo Feminino da Ave

ZZ – Cromossomo Masculino da Ave

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Revisão Anatômica.....	4
2.2 Métodos de Sexagem.....	5
2.2.1 Radiologia.....	5
2.2.2 Ultrassonografia.....	6
2.2.3 Laparoscopia.....	6
2.2.4 Análise Citogenética.....	7
2.2.5 Técnica de PCR.....	8
2.2.6 Biometria.....	10
2.2.7 Análise Fecal – Radioimunoensaio (RIE).....	10
2.2.8 Ressonância Magnética.....	11
2.2.9 Espectrometria de Múltiplos Ângulos.....	12
2.3 Tomografia Computadorizada.....	13
2.4 Protocolo de Contenção para Aves.....	15
2.4.1 Contenção Física.....	15
2.4.2 Contenção Farmacológica.....	16
3 OBJETIVOS.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Animais Utilizados.....	21
4.2 Escolha da Espécie.....	22
4.3 Equipamento de Tomografia Computadorizada.....	23
4.4 Preparação da Ave para Exame.....	23
4.5 Protocolo Anestésico.....	25
4.6 Exame Tomográfico.....	26
4.7 Recuperação Anestésica.....	28
4.8 Análise dos Exames Tomográficos.....	28
4.9 Exame comparativo (Análise do DNA).....	29

4.10	Dosagem de Radiação Emitida.....	29
5	RESULTADOS.....	32
5.1	Protocolo Anestésico.....	32
5.2	Protocolo dos Exames Tomográficos.....	33
6	DISCUSSÃO.....	42
6.1	Protocolo Anestésico.....	42
6.2	Posicionamento da Ave.....	43
6.3	Protocolo do Exame Tomográfico.....	43
6.4	Característica Gonadal.....	44
6.5	Análise comparativa entre Exames Tomográficos e PCR na identificação gonadal.....	44
6.6	Nível de Radiação.....	45
7	Conclusões.....	47
8	Referências.....	49
9	TRABALHO CIENTÍFICO.....	56
	Anexos.....	71

LEHMKUHL, R.C. **Identificação do sexo de psitacídeos (*Amazona aestiva*) por meio da avaliação gonadal, utilizando a tomografia computadorizada (TC).** Botucatu, 2010. 72 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a técnica de tomografia computadorizada como meio da visibilização e identificação dos órgãos reprodutivos (gônadas). Utilizou-se 38 aves da espécie *Amazona aestiva*, com sexo indeterminado e idade superior a cinco anos, para realizar o exame tomográfico utilizou-se anestesia dissociativa a base de quetamina e xilazina. As aves foram posicionadas em decúbito dorsal, e realizou-se os cortes axiais com intervalo de um milímetro. As imagens tomográficas adquiridas foram submetidas à reconstrução multiplanar (MPR) com cortes dorsais e sagitais, possibilitando a caracterização das gônadas tanto masculina, quanto feminina, com 100% de eficiência, confirmadas por meio de análise comparativa com técnica de polimorfismo de DNA, demonstrando a eficácia da tomografia computadorizada na avaliação e sexagem de psitacídeos da espécie *Amazona aestiva*.

Palavras-chave: Tomografia Computadorizada, Psitacídeos, Gônadas, Sexagem, Papagaio.

LEHMKUHL, R.C. **Sex determination of parrots (*Amazona aestiva*) by gonadal assessment using computed tomography (CT)**. Botucatu, 2010. 72 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the technique of computed tomography (CT) to visualize and identify the reproductive organs (gonads). Thirty-eight *Amazona aestiva* parrots of unknown sex, older than 5 years of age were used. For anesthesia, ketamine and xylazine were administered. The birds were placed in dorsal recumbency for CT and images were acquired with axial slices at 1-mm collimation. Multiplanar reconstruction (MPR) was performed using dorsal and sagittal slices in order to identify male and female gonads, reaching 100% efficiency as confirmed by the DNA polymorphism technique, so demonstrating the efficacy of the tomography for sexing Psittacidae parrots of the species *Amazona aestiva*.

Key-words: Computed Tomography, Psittacidae, Gonads, sexing, Parrot.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA), por meio das Portarias 117 e 118 de 15 de outubro de 1997, normatizou a criação de espécies silvestres nativas e a comercialização de animais vivos, abatidos, partes e produtos da fauna nativa, o que proporcionou nos últimos anos um incremento na reprodução de psitacídeos reproduzidos em cativeiro.

A Legislação Ambiental Brasileira (Portaria nº. 005/91-N), publicada em 25 de abril de 1991, determina que seja realizado o acasalamento de animais da fauna nativa, mantidos em cativeiro, que façam parte da lista oficial de espécies ameaçadas de extinção. Frente à importância da preservação destes animais aliado a obrigatoriedade determinada por lei, estudos se fazem necessários para avaliar as causas que ameaçam a conservação de espécies em cativeiro. Entre as causas, a mais problemática é a dificuldade de se reproduzir em cativeiro, que vem merecendo atenção especial.

O estudo e a compreensão da fisiologia reprodutiva destas espécies são da maior importância visando proporcionar a sua procriação de maneira segura, que evite as suas extinções promovendo uma melhor assistência para o sucesso do seu ciclo reprodutivo. Para o estudo da fisiologia reprodutiva, há necessidade de se buscar métodos confiáveis para sexagem. Os métodos de sexagem são indispensáveis para as aves sem dimorfismo sexual, que é uma das particularidades dos psitacídeos. Segundo Griffiths (2000), mais da metade das aves existentes no mundo possuem esta característica.

É importante frisar que a técnica de tomografia computadorizada utiliza a radiação ionizante e, talvez por isso, não tenha ainda sido usada para realização de exames rotineiros em aves; porém trata-se de uma técnica rápida, indolor e não invasiva, já disponível em grandes centros de referência espalhados pelo mundo; e com o avanço da tecnologia nesta área com os tomógrafos de última geração (multislice) a contribuição será ainda maior.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

Existem diversas técnicas disponíveis que facilitam o procedimento da sexagem das aves, sem dimorfismo sexual, tais como: avaliação radiográfica, ultrassonografia, sexagem cirúrgica por laparoscopia, a análise de DNA (PCR), a análise citogenética, biometria, análise fecal, a ressonância magnética e mais atualmente a avaliação de plumagem por espectrometria de múltiplos ângulos (TOMASULO, 1998; RUPLEY, 1999; SICK, 2001; GRANDO, 2002; SANTOS et al., 2006). Destas técnicas deve-se ainda considerar o efeito tempo para resultado do exame e se a técnica empregada é ou não invasiva.

Na ordem dos passeriformes, que compreendem mais de 54 famílias e cerca de 5000 espécies, existe uma prevalência da característica de dimorfismo sexual, sendo o macho com plumagem mais exuberante e as fêmeas com cores menos evidenciadas (SICK, 2001). Contudo a ordem psittaciformes, constituída por 78 gêneros e 344 espécies, das quais cerca de 100 ocorrem na América do Sul e aproximadamente 72 espécies no Brasil, não apresentam este dimorfismo, sendo considerado o país mais rico em representantes desta família (SICK, 2001; ALLGAYER e CZIULIK, 2007).

Nos psitacídeos, as espécies comumente não apresentam dimorfismo sexual evidente e o pareamento de aves do mesmo sexo constituem uma causa comum de falta de sucesso reprodutivo em psittaciformes (RUPLEY, 1999).

2.1 REVISÃO ANATÔMICA

É necessário que se conheça a anatomia interna das aves e principalmente os órgãos reprodutores. Canny (1998), lembra que os rins são simétricos e se localizam na fossa do sinsacro, caracterizando apenas uma pequena diferença entre número de lobos conforme a ordem dos passeriformes e não passeriformes. Os não passeriformes apresentam o rim dividido em lobo cranial, medial e caudal e nos passeriformes os lobos medial e caudal são fusionados.

Os ovários e ovidutos das aves se desenvolvem como estruturas pares, eles logo se tornam assimétricos no embrião. A maioria das fêmeas apresenta

apenas o ovário esquerdo desenvolvido de localização ventral e a frente do rim esquerdo. Em aves imaturas o ovário tem como característica ser achatado e triangular, com uma superfície tenuamente granular e sem a presença de folículos. Já em ovários ativos observam-se vários folículos, que apresentam rápido crescimento e maturação dando aparência de cachos de uvas. O ovário normalmente apresenta coloração branco-creme. Durante a estação não reprodutiva, o ovário e o oviducto regredem e muitos folículos pequenos podem permanecer presentes (RUPLEY, 1999).

Nos machos, os testículos se localizam no pólo cranial renal, dispostos simetricamente em cada lado da linha média no teto do celoma, e apresentam a superfície lisa, variando em tamanho, forma e coloração; as glândulas acessórias estão ausentes. Nas aves imaturas são pequenos e tem forma de feijão e durante a estação reprodutiva podem aumentar de volume variando de 10 a 500% (RUPLEY, 1999). Para McDonald (1982), os testículos são oblongos quando maduros e em atividade sexual, ou cilíndricos quando imaturos. Em ambas as situações, apresentam-se lisos e com coloração branco-creme, podendo ser melânicos (preto-esverdeado) em algumas espécies. Uma característica a ser observada é que ambos os testículos estão circundados cranialmente pelos sacos aéreos abdominais.

2.2 MÉTODOS DE SEXAGEM

2.2.1 RADIOLOGIA

É possível a visualização radiográfica das gônadas, porém depende do sexo e do estado reprodutivo da ave, sendo que durante a estação reprodutiva as gônadas aumentam de tamanho e podem ser visibilizadas em projeções laterolateral direita ou esquerda ou ventrodorsal, com radiopacidade de tecido mole, localizando-se ventral e cranialmente ao rim (lobo cranial). Todavia, não é possível a diferenciação sexual pelo exame radiográfico tradicional (CANNY, 1998; PINTO, 2006).

2.2.2 ULTRASSONOGRAFIA

Hofbauer e Krautwald-Junghanns (1999), utilizando um transdutor setorial mecânico de 7,5 MHz em ângulo de 60°, concluíram que a ultrassonografia não deve ser utilizada em aves como uma técnica eletiva para avaliação abdominal, devido as particularidades anatômicas das espécies, tais como presença dos sacos aéreos caudais e dos ossos pneumáticos, pois estes dificultam as avaliações, assim como, dependendo da espécie, existe a necessidade de arrancamento de penas, emprego da anestesia e, às vezes, o uso de bloco de gel (*“standoff”*), em razão do tamanho da ave (≤ 70 gramas). Entretanto, para avaliação do trato urogenital, se mostrou uma técnica simples, correta e rápida, considerando espécies de maior tamanho e peso. Estes dados são semelhantes aos descritos por Mcmillan (1994). Porém, para Krautwald-junghanns (2007), a ultrassonografia do sistema reprodutivo só terá êxito se realizada em animais sexualmente ativos, quando os testículos estão aumentados e há presença de folículos ovarianos em desenvolvimento, assim como existe a possibilidade de se encontrar ovos no oviducto e falta de contratilidade deste em relação ao intestino.

2.2.3 LAPAROSCOPIA

Dentre as técnicas utilizadas, a sexagem cirúrgica por meio de laparoscopia é uma das mais antigas. Para Taylor (1994), o exame de endoscopia é indicado sempre que a inspeção visual de um órgão ou região proporcionar informações melhores para um diagnóstico adicional. Segundo McDonald (1982), os endoscópios rígidos começaram a ser utilizado para esta finalidade no início dos anos 80, apesar de ser considerada por alguns autores como uma técnica invasiva (GRANDO, 2002). Autores como Raso e Werther (2004), afirmam ser uma técnica rápida, segura e com custo relativamente baixo, e que a utilização de uma haste rígida do endoscópio com 2,7mm de diâmetro, não interferiu na laparoscopia de indivíduos com menos de 200 gramas de peso, apesar da indicação para animais de 20 a 200g utilizar equipamento com 1,9 mm de diâmetro (JONES et. al., 1984; KRAUTWALD-JUNGHANNS, 2007).

Com relação ao ponto de incisão para colocação da haste do endoscópio rígido, existem diferentes regiões. Para Krautwald-junghanns (2007), são três: a do ângulo formado entre a parte proximal do fêmur e o segmento anterior do osso púbico, a que tracionando a perna esquerda ventrocranialmente e utilizando a região central do fêmur e a penúltima costela; e a do ângulo formado entre a última costela e a ponta do esterno. Já para Taylor (1994), existe um ponto, no qual se traciona a perna esquerda cranialmente, para visualizá-lo entre a extremidade caudal da oitava costela, o músculo flexor crural medial e o osso púbico. Griffiths (2000) considera como ponto de eleição a realização de uma incisão abdominal entre as duas últimas costelas pelo lado esquerdo.

Todos os autores concordam que se deve considerar: o tamanho do paciente, a época do ano devido ao tamanho das gônadas, o risco da anestesia e principalmente o risco da cirurgia, pois lembram que existe a possibilidade de ruptura de saco aéreo, o que pode comprometer o desenvolvimento reprodutivo, caso ocorram aderências ou outras complicações (JONES et. al., 1984, TAYLOR, 1994, GRIFFTHS, 2000, RASO e WERTHER, 2004, KRAUTWALD-JUNGHANNS, 2007). Raso e Werther (2004), relatam ainda a necessidade de se evitar a laparoscopia em indivíduos obesos, para não acarretar possíveis lesões em vísceras abdominais durante o procedimento.

2.2.4 ANÁLISE CITOGENÉTICA

Análise citogenética, bandagem cromossômica ou cariotipagem é realizada para a determinação das características cromossômicas das várias espécies de aves e tem contribuído sobremaneira para o estabelecimento das relações taxonômicas e evolutivas entre vários grupos de aves, auxiliando na identificação e caracterização das espécies, e na inclusão de uma espécie em um táxon ou possibilitando a identificação do sexo (ROCHA, 1993).

No estudo do cariótipo, os cromossomos são contados, medidos e morfológicamente analisados, mas para isso é necessário que se obtenha cromossomos metafásicos (próprios para esta análise). É considerada uma técnica, não invasiva quando analisadas nas penas, porém depende da

retirada de penas jovens, o que pode ser considerado um processo doloroso para o animal e requer envio imediato dentro do máximo de 36-40 horas. Também necessita de um número adequado de penas (4 a 8), para permitir quantidade de material para análise (GRANDO, 2002). Os métodos utilizados para análise citogenética são de 2 tipos: 1- Métodos diretos que utilizam células em proliferação, como bulbo de penas jovens (fibroblastos), medula óssea ou tecidos embrionários e 2- Os métodos indiretos que utilizam cultura de tecidos com ou sem estímulo, como por exemplo cultura de sangue periférico (estimulada) ou de fibroblastos (não estimulada) (CASTRO, 1997).

O método mais utilizado no Brasil para se obter células em divisão para a análise citogenética é a preparação direta de bulbo de penas jovens. Para evitar o desgaste de ter de arrancar de 6 a 8 penas, com repetição após 10-20 dias, e para obter um material com maior índice mitótico, pode-se optar pela cultura de sangue periférico. Normalmente esta cultura não é usada para aves por não apresentar bons resultados, ao contrário do que ocorre com mamíferos (CORREIA et. al., 2009). Os dados citogenéticos, no entanto, deve completar, suplementar, ou ainda, corrigir as conclusões derivadas dos estudos clássicos de morfologia e anatomia, levando em conta as peculiaridades de cada grupo taxonômico (CARVALHO, 1989).

2.2.5 TÉCNICA DE PCR

Já a análise de DNA, realizada pela reação de amplificação de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), é uma técnica considerada rápida (36 horas) para laboratórios especializados. É uma técnica que apresenta elevado grau de confiabilidade, tendo o inconveniente de não demonstrar eficiência em algumas espécies de aves (ratitas), dependendo da coleta de sangue dos animais em estudo o que por esta característica também é considerada como uma técnica invasiva (TOMASULO, 1998).

A combinação de genes herdados do pai e da mãe é disposta em estruturas conhecidas como cromossomos e são dispostos em pares, em um destes pares cromossômicos se encontra o gene que determina o sexo, sendo chamados de cromossomo sexual. Nos mamíferos os cromossomos sexuais dos machos são chamados de X e Y e nas fêmeas ocorre a duplicidade do X.

Na maioria das aves os cromossomos recebem nomes diferentes e a sua relação com o sexo é oposta a dos mamíferos, ou seja os machos são homozigóticos (ZZ) e as fêmeas são heterozigóticas (ZW) (SMITH, 2007). Morfologicamente o cromossomo Z é maior que o cromossomo W, a exceção descrita acima esta em relação à família das Ratitas (ema e avestruz).

Segundo Ansari et. al. (1988), os cromossomos sexuais destas aves são morfologicamente indistinguíveis, ou seja, Z e W apresentam o mesmo tamanho e morfologia, enquanto que em algumas espécies de aves de rapina o cromossomo sexual W, pode se apresentar ligeiramente maior que o Z.

A técnica de PCR (*polimerase chain reaction*) ou reação em cadeia de polimerase consiste na obtenção de fragmentos de DNA, onde são encontrados os genes CHD (*chromo-helicase-DNA-binding*). Este gene apresenta polimorfismo entre os cromossomos Z e W, sendo assim, denominados de CHD-Z e CHD-W. Quando se realiza a prova de PCR, existe um aquecimento a 94°C, que fará com que exista um rompimento das pontes de hidrogênio que mantém ligações entre a adenina – timina e a guanina – citosina, separando-se assim as hélices do cromossomo. Quando se resfria a molécula (30° a 65°C) as mesmas voltam a se ligar, e é neste momento que se faz a adição dos *primers* (nucleotídeos com função de sequência complementar de DNA, que se ligam às hélices delimitando a cópia do fragmento a ser investigado). Após este procedimento, a solução é reaquecida a 72°C, para que a *Taq polimerase* (enzima responsável pela polimerização de novas fitas de DNA) crie moléculas complementares, que em solução tampão a base de magnésio e água, criarão um meio ideal de pH e salinidade, aonde ao final de 5 horas haverá milhares de cópias da molécula inicial. Após este processo, o material amplificado passa por um processo de eletroforese em gel de agarose. A esse gel é adicionado um marcador que se liga ao DNA da amostra, que é visível em luz ultravioleta, possibilitando a visualização das bandas de DNA para conclusão da análise. As aves do sexo masculino apresentam duplicidade do gene CHD-Z e as fêmeas apresentam reação para gene CHD-Z e CHD-W (ANSARI, et. al., 1998; TOMASULO, 1998; SMITH, 2007; MATTA CAMACHO et. al., 2009) (anexo 04).

2.2.6 BIOMETRIA

Serve para diferenciação de aves monomórficas pela avaliação de medidas externas, porém deve-se considerar a particularidade de cada espécie. Bedrosian et. al (2008) trabalharam na avaliação morfométrica de corvo comum (*Corvus corax*), considerando 13 áreas de mensuração externa. O peso total e o comprimento dos pés foram às mensurações que demonstraram diferença significativa na relação macho / fêmea, e foram comparadas com resultados obtidos pela análise sanguínea por PCR. Os autores concluíram que não poderiam determinar com 100% de precisão, e que as medidas biométricas seriam válidas, uma vez que o resultado obtido da análise biométrica foi de 97% para fêmea e 91% para macho. Além disso, salientaram que apesar de terem tido um êxito acima de 91%, seria necessário a realização de mais pesquisas, pois consideraram, que se tivessem avaliado a biometria do osso pélvico, talvez tivessem obtido melhores resultados.

Scolaro (1987) já havia descrito, com sucesso, que das onze medidas morfométricas por ele propostas, em Pingüins de Magalhães (*Spheniscus maguelanicus*) as principais seriam o comprimento e largura do bico e o comprimento do indivíduo, chegando a um grau de acerto de 95,7%, quando analisadas estas variáveis somente. Para Castro (1997), a análise de medidas morfométricas se mostrou significativa em *Ramphastos toco* e não significativa em *Ramphastos dicolorus*, provavelmente devido ao baixo número de indivíduos utilizados no experimento. No caso do *R. toco*, a região que demonstrou melhor a diferença entre o macho e a fêmea foi o comprimento do culmen, comprimento do tórax, comprimento do bico inferior e a abertura da cloaca (distância entre as extremidades do púbis).

2.2.7 ANÁLISE FECAL – RADIOIMUNOENSAIO (RIE)

Entre as técnicas atualmente empregadas observa-se a análise de esteróides fecais. Este método avalia a proporção entre estrógenos e testosterona nas descargas cloacais, onde se esperam achar proporções mais altas de estrógenos nas amostras oriundas das fêmeas, do que as obtidas de machos. A grande vantagem deste método está na forma de obtenção das

amostras, pois não há necessidade de contenção física, e muito menos química; basta que o pesquisador obtenha e armazene a amostra imediatamente após a liberação da descarga cloacal. Para se observar um maior grau de precisão nos resultados obtidos é necessário manter as amostras em gelo, desde o momento da coleta até o processamento, garantindo assim a estabilidade dos hormônios. Os resultados podem ser afetados pela idade do animal e pela época de colheita (CERIT e AVANUS, 2007).

Dias e Oliveira (2006) extraíram os andrógenos e estrógenos fecais da descarga cloacal de psitacídeos, utilizando tampão fosfato salino (PBS) e uma solução PBS: Álcool Etílico (4:1), e a mensuração hormonal foi realizada em “kits” comerciais para radioimunoensaio no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) da FMVZ/USP. Foi obtido um resultado de confiabilidade de 70%, corroborando com resultados obtidos por outros autores, que demonstram ficar próximo a estes valores. Além disso, foi verificado que em criadouros aonde as famílias já haviam sido formadas, já existia a relação de dominância e subserviência para com outros indivíduos, inclusive entre animais do mesmo sexo.

2.2.8 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

A ressonância magnética (RM) é um método que consiste na formação da imagem por meio da magnetização transversal ao longo de uma amostra, fazendo com que haja contraste dos tecidos devido às diferentes quantidades de núcleos de hidrogênio (quantidade de água). Este processo se compara a ultrassonografia como um método de emissão-resposta, ou seja, a amostra a ser analisada é submetida a um determinado estímulo magnético e segundo o tipo de tecido envolvido, emite um sinal de resposta a ser processado pelo equipamento (GRANDO, 2002).

Segundo Filho et. al. (2000), a tomografia por ressonância magnética nuclear (TRMN) é um processo rápido, não invasivo, indolor e eficiente para sexagem de aves adultas em fase de estímulo sexual, porém apresenta dificuldades de sexagem em indivíduos jovens, se comparada a outras técnicas.

Já Czisch et. al. (2001), realizaram a RM em aves do gênero Passeriforme, sem a utilização de anestesia, apenas sob contenção física utilizando de um dispositivo especial para contenção das asas e abdome, tornando a ave imóvel durante o exame. O procedimento durou aproximadamente vinte minutos, entre a calibração e a liberação da ave. Para o procedimento foi utilizado um equipamento com capacidade de sete tesla (300 MHz), concluindo ser possível a sexagem de aves passeriformes inclusive fora do período reprodutivo. Em procedimento semelhante de RM, Grando (2002), realizou exames de TRMN em psitacídeos, sob anestesia geral e constatou a necessidade desta por período superior a 40 minutos, devido ao período de processamento das imagens e a capacidade de emissão do campo magnético (dois tesla – 85 MHz), e concluiu ser possível a utilização da ressonância em aves sexualmente maduras e em fase de estímulo sexual.

A técnica de RM é importante devido à capacidade de diferenciação dos tecidos em virtude da presença de água, mas principalmente pela não emissão de agentes ionizantes, porém é ainda bastante limitada devido ao custo do equipamento e manutenção do mesmo (periodicidade e técnico para manuseio). Deve-se considerar o risco anestésico, pois observa-se a relação de tempo anestésico comparado à potência de emissão do campo magnético.

2.2.9 ESPECTROMETRIA DE MÚLTIPLOS ÂNGULOS

A técnica está baseada na inabilidade tricromática do olho humano em perceber luz próximo ao espectro ultravioleta. A espectrometria é uma nova técnica que permite aos humanos reconhecer um maior número de cores, percebida pelo olho das aves (tetracromática). Usando a espectrometria de múltiplos ângulos, pesquisadores têm reconsiderado algumas espécies de aves classificadas até então como sexualmente monomórficas (psitacídeos), que foram reclassificadas como sexualmente dimórficas (SANTOS et al., 2006). Usando esta técnica em aves da espécie *Amazona aestiva*, foi desenvolvido um modelo com 100% de precisão, baseando-se em características de plumagem, porém em algumas áreas (testa e base da asa) observou-se uma possibilidade de erro. Esta técnica consiste na diferença de absorção de luz

ultravioleta refletida pela ave e absorvida por outro indivíduo, determinando-se assim o seu sexo (SANTOS et al., 2006).

2.3 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

O avanço tecnológico dentro da área de radiologia veterinária, vem crescendo, e facilitando o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico por imagem, tal como a tomografia computadorizada (TC). Segundo Tidwell (2007), isso já é uma realidade em centros de referência, corroborando com o que é observado em grandes universidades brasileiras.

A TC surgiu em 1971, por meio de pesquisas desenvolvidas pelo engenheiro Godfrey Newbold Hounsfield e pelo físico e matemático, Allan MacLeod Cormack, os quais receberiam o prêmio Nobel de fisiologia e medicina no ano de 1979. Inicialmente tinham as unidades de densidade denominadas EMI (Nome da empresa que patrocinou o experimento), e que foi rebatizadas de unidades Hounsfield, eternizando a importância do invento para a medicina moderna (CARVALHO, 2007).

Os primeiros tomógrafos foram denominados de 1ª geração. Com o passar do tempo foram incorporadas novas tecnologias, tornando a TC mais avançada e denominando-se de 2ª, 3ª e 4ª geração. A partir da década de 80 surgiram os tomógrafos helicoidais, sendo que os primeiros desta geração apresentavam apenas uma fileira de detectores, sendo denominados de *singleslice* (FARFALLINI, 2003, LEITE et. al., 2007). Ao final da década de 90, surgiu o primeiro tomógrafo multislice (duas ou mais fileiras de detectores), equipamento com maior capacidade de escanear um maior número de cortes em menor espaço de tempo, o que reduziu consideravelmente o tempo de anestesia e exposição aos raios-x, diferentemente dos equipamentos mais antigos (FARFALLINI, 2003).

Para obter uma imagem em TC, o paciente é colocado numa mesa que se desloca para o interior de um anel de cerca de 70 cm de diâmetro, sendo que o tubo de raios-x e os sensores de dispositivo de carga acoplada (CCD – *Charge Couple Device*), ficam dispostos em lados opostos, a este anel, denomina-se *gantry* ou pórtico. Os sensores de CCD são responsáveis por captar a radiação, que devido a um conversor digital transforma os impulsos em dados

digitais e transmitem essa informação ao computador ao qual está conectado. O conjunto de dados obtidos é denominado dados brutos (*raw data*) e as reconstruções de imagens utilizam estes dados para a formatação de diversos planos de reformatação. (QUESADA et. al., 2001; LEITE et.al., 2007).

Depois de obtidos, os cortes são transformados em imagens na tela do computador, no qual cada ponto é denominado de *pixels*, que é a representação digital de uma unidade de volume, o *voxel*, que além de largura e altura, representa a espessura do corte. Cada *pixel* da imagem é representado por um coeficiente linear de atenuação também conhecido por unidade Hounsfield (HU) e ao mesmo tempo representa a densidade média do voxel, aonde as estruturas formadas em uma imagem de TC são representadas por variações nas tonalidades de cinza. A quantidade de raios-x que atravessa o corpo determina o tom de cinza a ser utilizado. Esta tonalidade é mensurada e expressa em unidades Hounsfield (HU). Hounsfield determinou a água como sendo zero, a cortical óssea como sendo de até +1000 e o ar de -1000. Nas imagens, os valores negativos aparecem mais hipoatenuantes (escuros) e os valores positivos, são mais brancos (hiperatenuantes) (HATHCOCK e STICKLE, 1993; BERRY, 2002; TIDWELL, 2007).

Segundo Brooks (1993), existem diversas vantagens quando comparamos a TC em relação a exames radiográficos tradicionais, mas a principal vantagem é a inexistência de sobreposição de estruturas anatômicas na TC, além da possibilidade de observação de finas camadas devido à aquisição de imagens em cortes de diferentes planos. Outra vantagem é a possibilidade de visualização de tecidos moles em relação a outros tecidos. Porém, deve-se ressaltar que também existem desvantagens, tais como, altas doses de radiação e produção de artefatos quando da existência de corpos metálicos.

Stickle e Hathcock (1993) descrevem a necessidade de contenção química em pacientes da medicina veterinária, a fim de que não exista movimentação do paciente durante o exame, evitando-se desta forma a presença de artefatos.

Na literatura consultada, a tomografia computadorizada não apresenta estudos para uma descrição específica para sexagem, bem como técnicas para manipulação exclusiva em psitacídeos. Segundo Gumpenberger e Henninger (2001), em aves, pode-se observar os ovários das fêmeas, o tamanho, a forma,

a densidade e o posicionamento dos folículos, bem como identificar o tamanho e forma dos testículos nos machos, porém os autores não descrevem sua diferenciação para fim de sexagem nas aves, e não apresentaram um protocolo para este procedimento.

2.4 PROTOCOLO DE CONTENÇÃO PARA AVES

2.4.1 Contenção Física

Em aves de porte pequeno a médio, a forma de contenção é relativamente simples. A ave é contida da forma que seu pescoço fique entre o dedo indicador e o dedo médio e as asas contra a palma da mão e com a outra mão, o polegar e o indicador seguram a perna na junção do tarso com a tíbia. A contenção de aves de grande porte deve ser feita preferencialmente com o auxílio de outra pessoa, colocando-se então um pano escuro sobre a ave, deixando-se somente as pernas livres. Sempre que se manuseia uma ave de porte maior, segura-se inicialmente a cabeça, de modo a evitar ferimentos que ela possa ocasionar com o bico. Nas aves de rapina, a maior atenção deve ser dada às garras. Geralmente a colocação de um pequeno galho ou qualquer outro objeto entre os dedos da ave, faz com que ela feche as garras sobre ele, diminuindo consideravelmente o risco de acidentes (NETO, 2006).

As aves podem ser contidas com segurança por meios físicos, sendo comum a contenção manual da maioria das espécies para a realização de diversos procedimentos. É necessário o uso de equipamentos, como: luvas de couro, que não protegem contra bicadas de grandes psitacídeos, puçás; e as vezes redes, que costumam ser empregados para facilitar a contenção dos pacientes em grandes recintos (HAWKINS, 2009).

A respeito da contenção física, é importante frisar que aves não apresentam diafragma, assim, seus movimentos respiratórios são realizados basicamente pela musculatura peitoral, que eleva e abaixa o esterno. Caso o tórax do animal seja comprimido durante a contenção física, de maneira que o esterno não se movimente, o paciente poderá morrer por asfixia (CUBAS e GODOY, 2006).

2.4.2 Contenção Farmacológica

Para o procedimento de TC, se faz necessária à imobilização total da ave durante o exame, desta forma existe a necessidade de contenção farmacológica.

Uma das áreas mais controversas da prática da medicina veterinária em aves é a contenção química e o uso de anestésicos. É indicado em situações em que é necessário imobilização ou analgesia, entretanto, é fundamental efetuar a avaliação prévia das condições da ave, investigando a tolerância do paciente (MASSONE, 2003).

O uso de anestésico dissociativo (Quetamina), não é recomendado isoladamente, devido ao pobre relaxamento muscular e por provocar movimentos musculares involuntários, hipertonicidade e movimentos tônicos clônicos dos membros. A quetamina permite o uso associado com outros agentes, facilitando a contenção nos casos e nas espécies em que não promove todos os efeitos desejados, se administrada isoladamente (HAWKINS, 2009).

A quetamina é comumente combinada com agonista alfa-2-adrenérgico (xilazina), que adquiriu popularidade como medicação pré-anestésica, atuando em ampla gama de espécies domésticas e silvestres, podendo ser administrada por via intramuscular ou intravenosa e melhorando o relaxamento e a profundidade anestésica (HAWKINS, 2009).

Andrade (2002) relata que o grande uso da associação quetamina-xilazina é devido à abolição do efeito depressor profundo provocado pela xilazina, bem como a abolição da catatonia que a quetamina produz. O efeito sedativo e anestésico é alcançado quando esses medicamentos são aplicados em associação, ao passo que, se administrados isoladamente, o efeito é de intensidade menor, recomenda-se nesta combinação uma proporção de quetamina/xilazina de 10:1 (SINN, 1994).

As doses recomendadas por Sinn (1994), nesta associação são calculadas com base em uma dosagem de ketamina, de 5 a 30 mg/kg IM (ou 2,5 a 5,0 mg/kg, IV) associada com xilazina 1,0 a 4,0 mg/kg IM (ou 0,25 a 0,50 mg/kg, IV), Podendo substituir a xilazina pelo diazepam (0,5 a 2,0 mg/kg IM ou IV).

Para Cubas e Godoy (2006), a dose de xilazina recomendada para psitacídeos é de 1-2 mg/kg, por via intramuscular (IM), quando associada a quetamina na dose de 10-20 mg/kg e sempre lembrando que a quetamina se usada individualmente a dose pode ultrapassar 50 mg/kg.

Paul-Murphy e Fialkowski (2001) relatam a grande variação de doses existentes na associação de quetamina-xilazina, considerando as diferentes espécies, peso e metabolismo. De forma geral, esta associação é segura, mas necessita de conhecimento das características das espécies a serem anestesiadas. A imobilização induzida pela quetamina dura de 5 a 20 minutos e apresenta recuperação total entre 40 e 100 minutos (HAWKINS, 2009).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo:

Avaliar por meio do exame tomográfico o sexo das aves da ordem psittaciforme da espécie *Amazona aestiva* (Papagaio verdadeiro), fazendo uma relação ao tipo de gônada observada com sua localização, forma e tamanho, através de seus aspectos anatômicos imaginológicos. Assim como, comparar os resultados obtidos com a técnica de Polimerase Chain Reaction (PCR).

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 38 animais da espécie *Amazona aestiva* (Papagaio-verdadeiro), hígidos, com sexo desconhecido e idade superior a 5 anos, sendo 17 aves provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, 13 aves do Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros de Sorocaba-SP e oito aves do Parque Ecológico do Tiête, em São Paulo (Tabela 1).

TABELA 1 – Animais encaminhados ao Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Selvagens (CEMPAS) – FMVZ/UNESP - Botucatu, sob autorização 15818-1/SISBIO.

Origem	Identificação
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 121
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 125
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 130
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 170
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 237
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 239
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 240
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 245
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 248
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 283
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 290
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 291
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 300
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 302
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 305
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 321
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP-C- 676
Parque Ecológico do Tiête	PET 10.5- 14177
Parque Ecológico do Tiête	PET 10.5- 14281
Parque Ecológico do Tiête	PET 10.5- 14292
Parque Ecológico do Tiête	PET 10.5- 14303
Parque Ecológico do Tiête	PET 10.5- 14304
Parque Ecológico do Tiête	PET 10.5- 14306
Parque Ecológico do Tiête	PET 10.5- 14308
Parque Ecológico do Tiête	PET 10.5- 18134
Parque Zôo. Mun. Quinzinho de Barros	Soroc. 095
Parque Zôo. Mun. Quinzinho de Barros	Soroc. 162
Parque Zôo. Mun. Quinzinho de Barros	Soroc. 461
Parque Zôo. Mun. Quinzinho de Barros	Soroc. 463

Parque Zôo. Mun. Quinzinho de Barros	Soroc. 9090
Parque Zôo. Mun. Quinzinho de Barros	SOB 97-212
Parque Zôo. Mun. Quinzinho de Barros	SOB 97-211
Parque Zôo. Mun. Quinzinho de Barros	VAT - 107
Parque Zôo. Mun. Quinzinho de Barros	YURI - 033
Parque Zôo. Mun. Quinzinho de Barros	AZIBR - 418
Parque Zôo. Mun. Quinzinho de Barros	Médio 01
Parque Zôo. Mun. Quinzinho de Barros	Pequeno 02
Parque Zôo. Mun. Quinzinho de Barros	Amarelo 03

4.2 ESCOLHA DA ESPÉCIE

O Brasil é o País mais rico em aves da família Psittacidae, desta forma optou-se por aves do gênero *Amazona aestiva* (Figura 1), por serem indivíduos de fácil manipulação, encontrados em grandes quantidades em zoológicos e centros de triagem de animais silvestres (CETAS), facilitando desta forma a sua obtenção. Os psitacídeos apresentam um grande numero de espécies ameaçadas de extinção e com monomorfismo, o que justifica esta proposição.



FIGURA 1: Exemplos do Gênero *Amazona aestiva*, utilizados para fins de sexagem por tomografia computadorizada (TC).

4.3 EQUIPAMENTO DE TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Foi utilizado um aparelho de tomografia computadorizada helicoidal de terceira geração Marca SHIMADZU®¹, modelo SCT – 7800 TC, pertencente ao parque de equipamentos do Setor de Diagnóstico por Imagem, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu-SP (Figura 2).



FIGURA 2: Aparelho de tomografia computadorizada helicoidal do Setor de Diagnóstico Por Imagem da FMVZ/UNESP – Botucatu.

4.4 PREPARAÇÃO DA AVE PARA EXAME

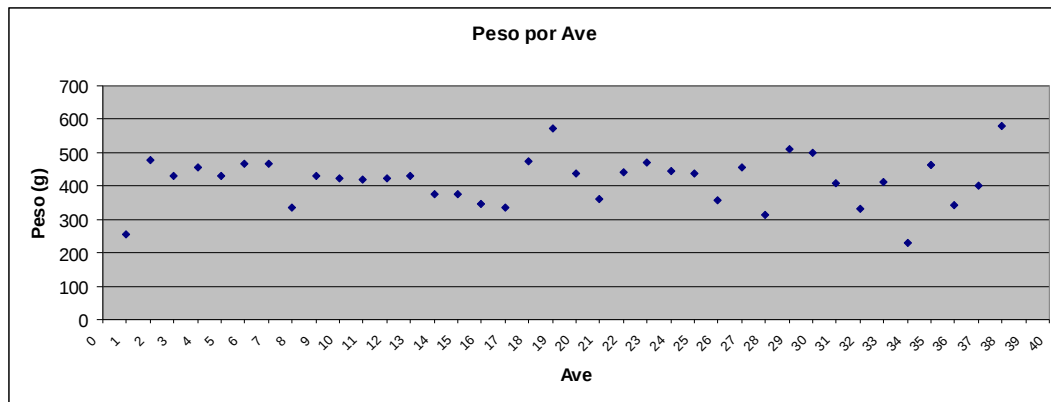
Todos os exames tomográficos foram realizados pelo período da manhã, devido à disponibilidade do técnico do setor, o que de certa forma facilitou o manejo, uma vez que os animais estavam em jejum alimentar superior a 12 horas, água *Ad libitum* e sem estresse de manipulação. As aves foram encaminhadas ao prédio do Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Selvagens (CEMPAS), aonde em seu ambulatório, encontra-se uma balança

¹ Shimadzu do Brasil comércio Ltda. Av. Marquês de São Vicente nº 1771 – São Paulo – SP

marca Toledo², com precisão de 0,002 gramas até seis quilogramas e 0,005 gramas de seis a 15 quilogramas.

O peso médio dos animais ficou em 413,7 gramas (230 a 574 gramas), conforme Gráfico 1, indiferente ao sexo e a idade média foi superior a quatro anos.

GRÁFICO 1 – Peso das aves utilizadas no experimento.



Depois de pesados os animais foram transportados em caixas plásticas individuais (Figura 3) até o setor de diagnóstico por imagem, para realização do procedimento tomográfico.

Junto à sala de TC, existe uma ante-sala para procedimento de anestesia, local este, aonde os animais permaneciam após o exame, aguardando a recuperação anestésica para posteriormente serem soltos no recinto apropriado.

² Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda. Rua Manoel Cremonesi, 1 São Bernardo do Campo, SP



FIGURA 3: Caixas plásticas utilizadas para transporte das aves até o Setor de Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP – Botucatu.

Desde o momento de captura do animal no recinto até o procedimento anestésico, os animais foram manipulados com uso de luvas de couro para proteção contra possíveis arranhões e bicadas.

4.5 PROTOCOLO ANESTÉSICO

Os fármacos utilizados no procedimento anestésico foram o cloridrato de quetamina a 10%, na dose de 20mg/kg (0,2mL/kg) associada ao cloridrato de xilazina a 2%, na dose de 2mg/kg (0,1mL/kg). Após o cálculo da dose, baseado no peso de cada indivíduo, procedeu-se a administração, via intramuscular, na região do músculo peitoral (Figura 4). Foi utilizada seringa de insulina para doses de 100 unidades (1,0 cc), com agulha hipodérmica curta (13 x 4,5mm), sendo que se realizou suspensão do anestésico com solução de cloreto de sódio a 0,9%, em quantidade suficiente para 0,4 ml, devido a baixa dose.



FIGURA 4: Aplicação Intramuscular no músculo peitoral, de anestesia para procedimento de tomografia, observa-se a contenção física com uso de luva de couro.

4.6 EXAME TOMOGRÁFICO

Imediatamente após a ação da anestesia (período de latência), o animal foi colocado na mesa do tomógrafo sob uma almofada angulada (calha), em decúbito dorsal para a realização do exame, sem necessidade de outros tipos de contenção (Figura 5).



FIGURA 5: Realização do procedimento tomográfico observa-se o paciente em decúbito dorsal.

Foi realizado um *Scout* de cada animal buscando desta forma determinar o local a ser examinado, considerando para tal, a localização normal da gônada, posicionada ventral e cranialmente aos rins, bem como o possível tamanho das mesmas (Figura 6). O ponto central dos cortes foi determinado como sendo o pólo mais cranial dos rins, permanecendo 11 cortes para frente e doze para trás.

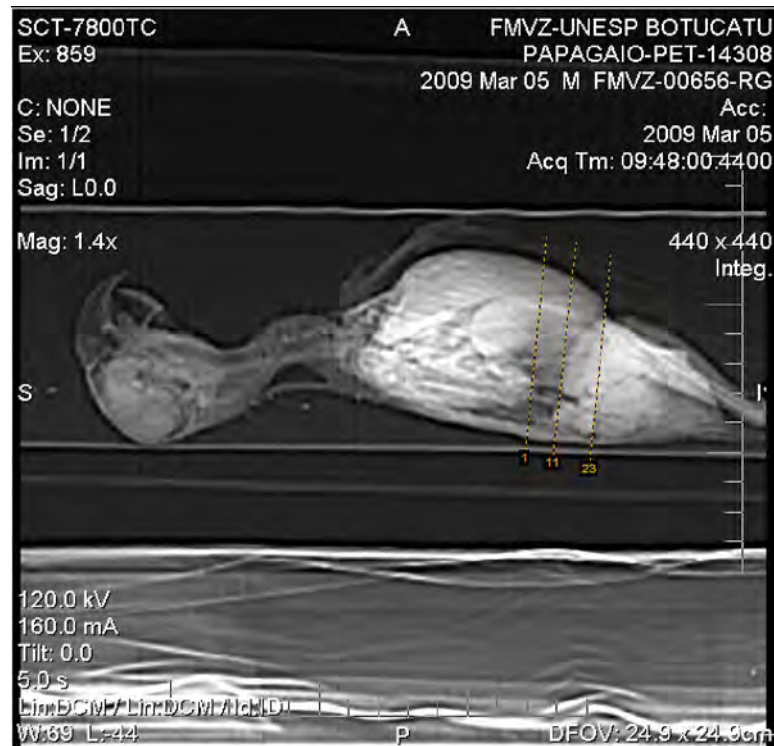


FIGURA 6: *Scout* realizado em *Amazona aestiva*, demonstrando área de corte total.

Após a determinação da região (Figura 6) foi realizado os cortes helicoidais em sentido transversal (axial), com espessura de 1mm e incremento de corte também de 1 mm (1x1), utilizando um protocolo de 120 Kv e 150 mA e filtro de endurecimento RF3, com área e tempo de corte de 23mm, devido a velocidade da mesa e a rotação do tubo serem de 1 mm.

Adquiridas as imagens transversais, estas foram salvas com extensão do tipo *Digital Imaging and Communications in Medicine* (DICOM) e armazenadas em disco rígido, *pen-drive* e DVD, para posterior avaliação.

4.7 RECUPERAÇÃO ANESTÉSICA

Após a saída do animal da sala de tomografia computadorizada, a ave era envolta em folhas de jornal, permitindo uma recuperação menos traumática e servindo como material de manutenção de calor, evitando-se a dissipação deste, sendo então colocada na caixa plástica de transporte coberta com pano, mantendo um ambiente de penumbra e calma.

O tempo médio de recuperação anestésica foi de 73,5 minutos (37 a 166 minutos).

4.8 ANÁLISE DOS EXAMES TOMOGRÁFICOS

Na análise das imagens tomográficas, inicialmente foi realizada uma avaliação do *scout*, para visualização total da área examinada, buscando dessa forma uma pré-visualização da região gonadal. Na sequência foi observado corte a corte cada um dos animais utilizando-se o filtro de endurecimento RF3. Em alguns casos houve a necessidade de alteração na janela de visualização, buscando-se o filtro para pulmão ou para osso. Para determinação do sexo da ave, considerou-se basicamente a localização e forma da estrutura gonadal que se visualizava (Figura 7).

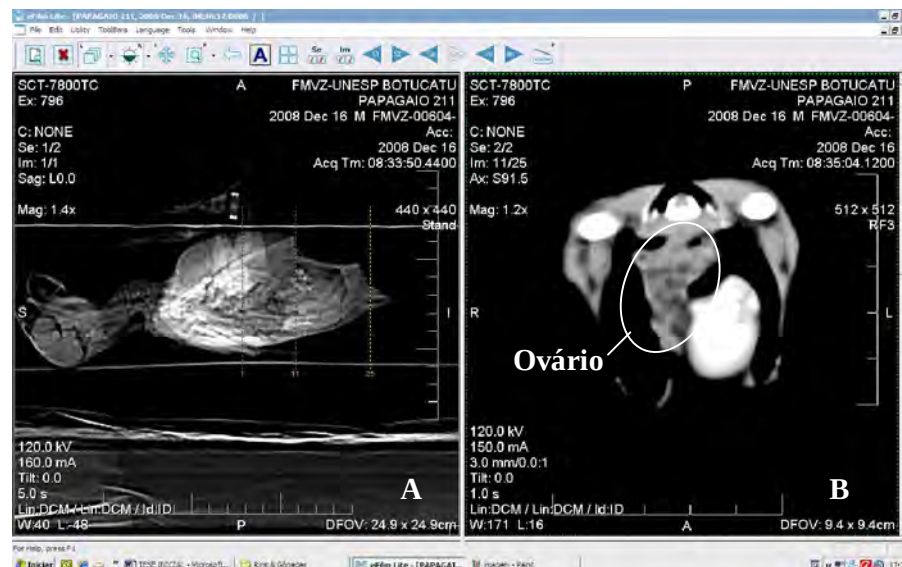


FIGURA 7: Tela da *Workstation* aonde se visualiza o *scout* (A) e o corte de número 11 de visualização da gônada, no caso ovário (B).

4.9 EXAME COMPARATIVO (Análise do DNA)

De acordo com a revisão de literatura o método de sexagem por análise do DNA tem eficiência de 100% com a característica de não ser uma técnica invasiva, podendo ser considerada a técnica “padrão ouro”. Foi realizada a colheita de duas gotas de sangue em papel filtro para o armazenamento e encaminhamento das amostras a um laboratório de tecnologia em DNA, com objetivo de servir de parâmetro de comparação, com os dados obtidos das imagens tomográficas, tendo como princípio a determinação da eficácia ou não do exame de tomografia computadorizada para a sexagem de psitacídeos da espécie *Amazona aestiva* (Papagaio-verdadeiro). Os resultados desta técnica estão apresentados nos anexos.

4.10 DOSAGEM DE RADIAÇÃO EMITIDA

Para fins de registro, realizou-se a medição de radiação emitida durante o procedimento tomográfico, por uma física médica do departamento de doenças tropicais e diagnóstico por imagem da FMB/UNESP – Botucatu, a qual realizou o procedimento seguindo os critérios de avaliação de radiação utilizando um fantoma que simulava o tamanho e o tipo de paciente que receberia a radiação, assim como o sensor de dosimetria para captação da radiação e análise final (Figura 8 e 9).

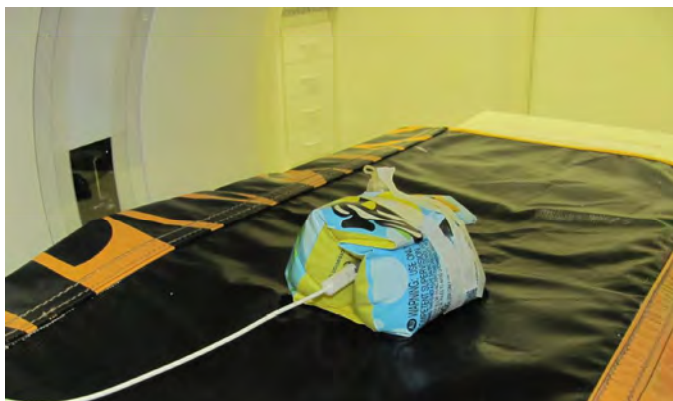


FIGURA 8: Fantoma com sensor de dosimetria em seu interior.

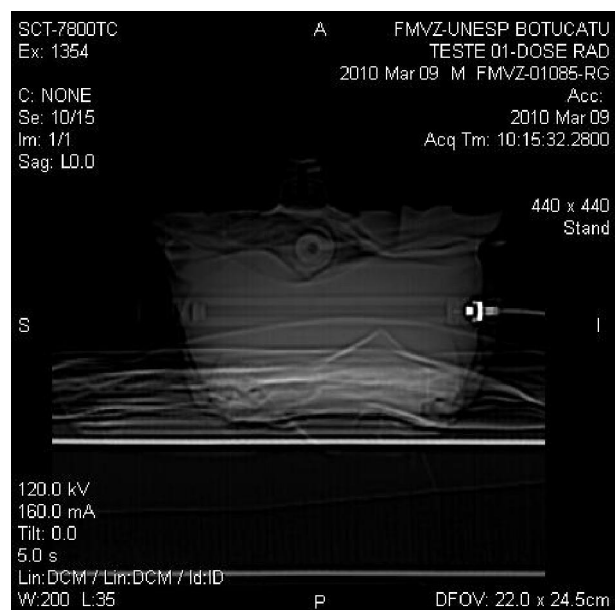


FIGURA 9: Scout demonstrando o posicionamento do sensor dentro do fantoma.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

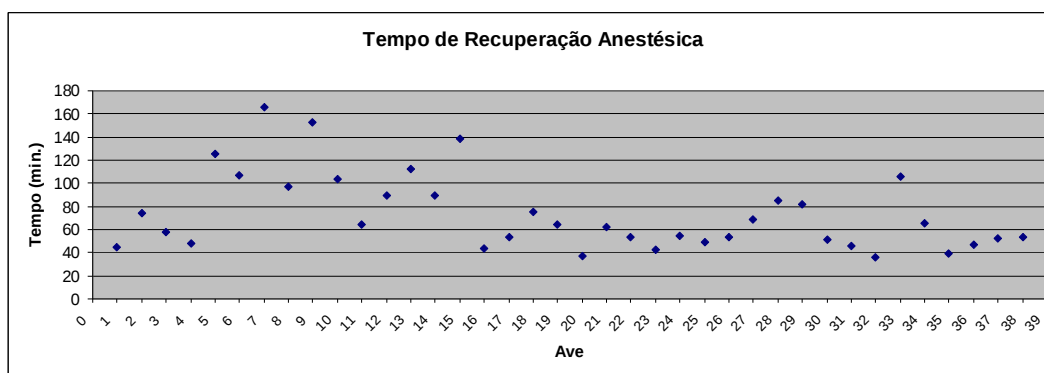
Todas as aves utilizadas no procedimento de sexagem por tomografia computadorizada helicoidal permaneceram em observação clínica durante 60 dias antes dos procedimentos, sendo acompanhadas quanto aos seus hábitos alimentares e possíveis alterações comportamentais, sendo consideradas clinicamente sadias e sem restrições ao procedimento anestésico e tomográfico.

5.1 Protocolo Anestésico

Inicialmente observou-se que o protocolo utilizado demandou um tempo de recuperação alto, com recuperação anestésica alterada (agitação, bater de asas e incoordenação), observando-se risco ao animal. Desta forma realizou-se a diminuição da quantidade (dose) de fármaco indicado, tendo assim um tempo de recuperação menor e mais adequado.

Ao analisarmos todos os protocolos anestésicos, observa-se uma grande variação no tempo de retorno anestésico, sendo de 37 a 166 minutos, com média de 73,5 minutos, conforme gráfico 2.

GRÁFICO 2 – Tempo de recuperação anestésica observada individualmente durante o protocolo de tomografia computadorizada, nas aves do experimento.



O protocolo anestésico inicialmente preconizado foi de cloridrato de quetamina a 10%³, na dose de 30mg/kg (0,3mL/kg) associada ao cloridrato de xilazina a 2%⁴, na dose de 3mg/kg (0,15mL/kg), porém observou-se que o período de recuperação foi superior a 90 minutos. Optou-se pela modificação deste protocolo, devido ao tempo de retorno elevado. Fez-se a diminuição do cloridrato de quetamina a 10%, para uma dose de 20mg/kg (0,2mL/kg) associada à diminuição também da dose de cloridrato de xilazina a 2%, para 2mg/kg (0,1mL/kg). Em ambos os protocolos fazia-se a suspensão dos fármacos em solução de cloreto de sódio a 0,9%, em quantidade suficiente para 0,4 ml de dose total.

Com a redução da dose dos fármacos, pode-se observar uma redução também no tempo anestésico para próximo de 50 minutos (gráfico 2).

5.2 Protocolo dos Exames Tomográficos

Foram analisados os exames tomográficos de 38 papagaios para fins de sexagem, sendo que inicialmente o espaçamento entre cortes foi de três mm, kVp= 120 e mA= 160, área total de corte de 72 mm, sendo o suficiente para visibilização das gônadas, porém devido a presença constante de gônadas com tamanho inferior ao esperado (0,5 a 2 cm de comprimento), optou-se pela redução da área de corte para 23 mm e do espaçamento de corte, passando a utilizar um mm entre cortes, mantendo-se o kVp e mA igual (Figura 10), passando a ser mais fidedigno, pois pode-se observar a gônada por inteiro (corte a corte) e havendo dificuldade podemos, realizar a reconstrução dorsal e/ou sagital.

³ Dopalen - VETBRANDS Brasil LTDA, Rua Manoel Joaquim Filho, N° 303, Paulínia - SP.

⁴ Anasedan PET - VETBRANDS Brasil LTDA, Rua Manoel Joaquim Filho, N° 303, Paulínia - SP.



FIGURA 10: Imagem tomográfica de scout, mostrando área total de corte, 75mm (A) e 23mm (B) com a mesma técnica de mA e kVp para a obtenção de imagem.

Após os exames, foi realizada análise preliminar de avaliação dos cortes tomográficos, quanto à qualidade da imagem e a possibilidade de realização da análise para fins de sexagem, sem utilizar o programa de reconstrução multiplanar, figuras 11 a 14.

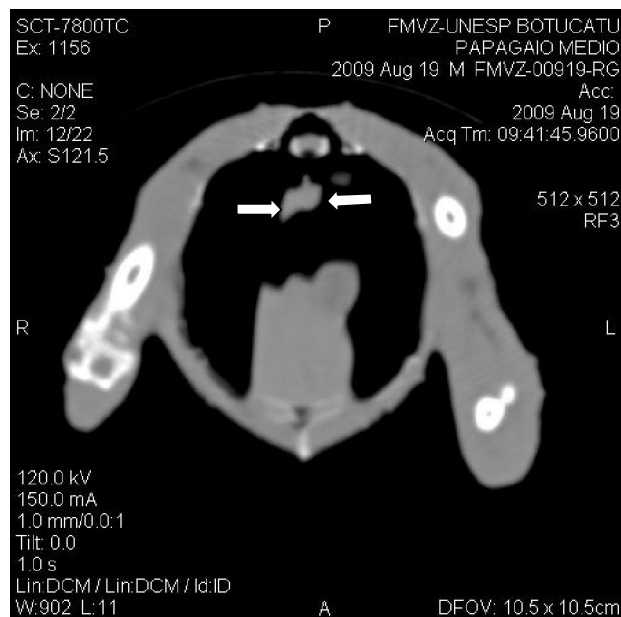


FIGURA 11: Observa-se as gônadas masculinas (testículos) em corte axial (Setas grossas).



FIGURA 12: Corte axial realizado 3mm caudal a figura anterior, demonstrando as gônadas masculinas (setas brancas) ventrais aos rins (dorsais).



FIGURA 13: Visibilização da gônada feminina (ovário) em corte axial (circulo branco).

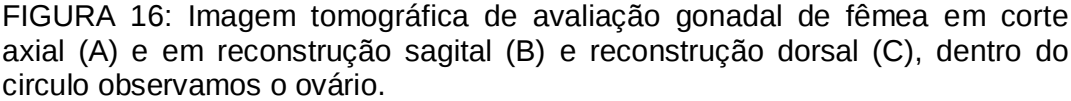


FIGURA 14: Corte axial realizado 2mm caudal a figura anterior, demonstrando a gônada feminina (circulo branco) ventral aos rins (setas).

Nas reconstruções dos cortes tomográficos obtivemos uma melhor visibilização das áreas analisadas, tanto para reconstrução sagital como dorsal facilitando desta forma o processo de avaliação gonadal (Figuras 15 e 16).



FIGURA 15: Imagem tomográfica de avaliação gonadal de macho em corte axial (A) em reconstrução sagital (B), sendo que dentro do circulo observamos os testículos e na seta branca o Rim e reconstrução dorsal (C).



Outra característica tomográfica observada foi a diferença no tamanho da gônada visualizada pelo procedimento tomográfico, tendo uma pequena variação no comprimento e no diâmetro dos testículos (Figura 17). Tendo o comprimento variado entre 5 a 15mm, e o diâmetro de 2 a 5mm, com média de 3mm. Para gônada feminina as alterações foram um pouco maiores devido à característica de apresentarem diversos folículos ovarianos com tamanhos distintos, onde foi observado ovários com comprimento variando de 10 a 35mm e diâmetro ao corte axial de 6 a 24 mm.



FIGURA 17: Imagem de corte axial demonstrando os testículos em corte de seu maior diâmetro, apresentando 5mm em ambas as gônadas.



FIGURA 18: Imagem de corte axial demonstrando o ovário em corte axial, apresentando 24 mm de diâmetro ovariano.

Das 38 aves que foram utilizadas neste projeto, todas inicialmente foram analisadas por exame tomográfico direto (cortes axiais), concluindo como sendo 24 machos e 14 fêmeas. Mas ao realizarmos todos os protocolos tomográficos com a ferramenta de reconstrução multiplanar (MPR), podemos constatar que quatro animais apresentavam um resultado diferente ao

apresentado apenas pelo corte axial, confirmando desta forma que tratava-se de 20 machos e 18 fêmeas, que em análise comparativa com a técnica “padrão ouro”, *polimerase chain reaction* (PCR), os resultados da sexagem foram iguais a este, com 100% de confiabilidade, quando analisadas todas as imagens obtidas (cortes axiais, dorsais e sagitais).

Se considerarmos apenas as avaliações de cortes axiais, pode-se observar que na análise estatística a diferença entre o observado e o esperado foi ao acaso ($\chi^2 = 1,81$ e $P = 0,1786$) a diferença observada é não significativa em nível de 5% de probabilidade.

Com relação aos quatro óbitos ocorridos durante a permanência dos animais no CEMPAS, foi observado em exames necroscópicos que ocorreram por infecção fúngica ou bacteriana em sistema respiratório, porém aproveitou-se o cadáver para documentar a forma, posição, característica e o tamanho das gônadas conforme observamos as Figuras 19 e 20.

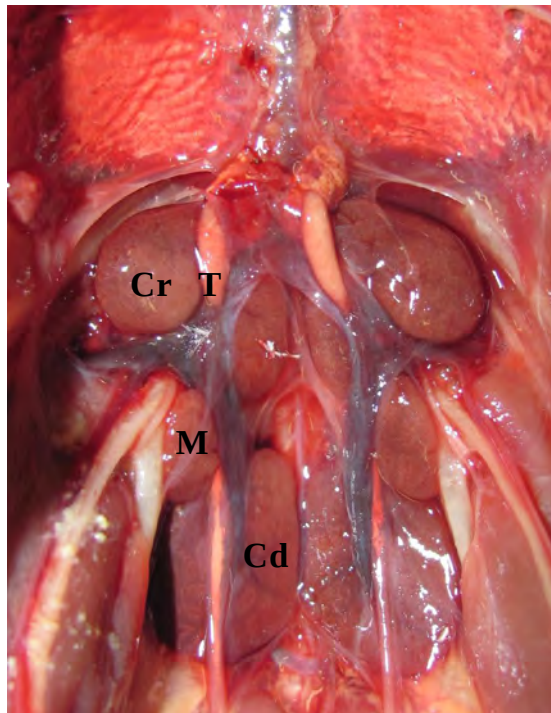


FIGURA 19: Visualização gonadal observa-se os testículos (T) de 5mm de comprimento, Lobo cranial do rim (Cr), lobo médio (M) e lobo caudal (Cd).

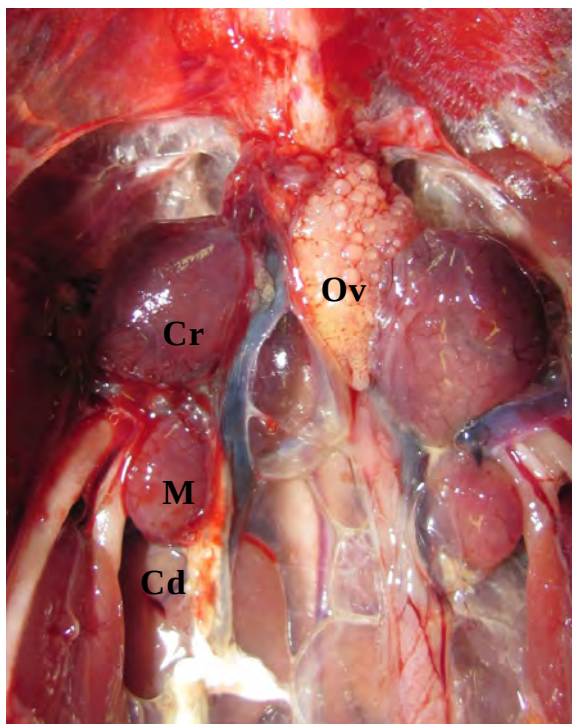


FIGURA 20: Visualização gonadal observa-se o ovário (Ov) de 12mm de comprimento, Lobo cranial do rim (Cr), lobo médio (M) e lobo caudal (Cd).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O grande dilema da sexagem de aves monomórficas está na técnica empregada para a realização do exame, pois se discute a condição do estresse causado pela contenção, o fator de ser ou não uma técnica invasiva, mas principalmente a questão do tempo para obtenção de resultado, e custo do procedimento por indivíduo.

No presente experimento, além dos itens citados acima deve-se salientar que se trata de uma técnica de diagnóstico por imagem, pouco difundida no Brasil para outras finalidades, em virtude do acesso ainda restrito à TC dentro da Medicina Veterinária.

6.1 Protocolo anestésico

O protocolo anestésico proposto inicialmente apresentou um tempo de recuperação anestésico elevado e com característica de recuperação inadequada (agitação, bater de asa e incoordenação), características já descritas nos fármacos utilizados (cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina) e por diversos pesquisadores (PAUL-MURPHY e FIALKOWSKI, 2001; MASSONE, 2003; HAWKINS, 2009). Ao diminuir as doses de ambos os fármacos, para 20mg/kg (0,2mL/kg) de cloridrato de quetamina associada 2mg/kg (0,1mL/kg) de cloridrato de xilazina, foi observado uma recuperação favorável e com pouco efeito adverso e com menor tempo de ação dos fármacos, passando de 120 minutos para menos de 50 minutos em média, conforme protocolo proposto por Cubas e Godoy (2006).

Não houve nenhuma ocorrência de óbito durante o procedimento de anestesia, do exame tomográfico e na pós anestesia, caracterizando assim como um protocolo adequado e seguro. Os casos de óbito registrados nos animais cedidos ao experimento ocorreram de forma isolada e constatou-se por exames necroscópicos tratar-se de doença de vias aéreas (fungo e bactéria), mas sem relação com o momento da anestesia, pois os quatro casos ocorreram de dois a três meses após a realização dos exames tomográficos.

6.2 Posicionamento da Ave

Quanto ao posicionamento da ave durante o exame tomográfico, levamos em consideração a adequação do paciente à mesa, em relação à região a ser estudada pela TC.

Em nosso estudo foi possível constatar que o melhor posicionamento na calha para psitacídeos do gênero *Amazona aestiva* foi o decúbito dorsal, uma vez que as aves permaneceram imóveis durante todo o protocolo tomográfico, sem alterações dos seus parâmetros fisiológicos, permitindo excelente visibilização dos rins e gônadas, o fato corroborou com a citação de Neto, (2006) que recomenda, a contenção física das aves em decúbito dorsal o que favorece a livre movimentação dos músculos peitorais para facilitar a respiração, devido a inexistência de diafragma nas aves. Por outro lado Grando (2002), constatou que em estudos de ressonância magnética o melhor posicionamento das aves foi o decúbito ventral. Ludders et.al. (1995), afirmaram que a ventilação se torna reduzida em aves posicionadas em decúbito dorsal, provavelmente pelo peso das vísceras sobre os sacos aéreos abdominais, reduzindo assim seu volume efetivo e levando a uma depressão respiratória.

Observamos nos testes pilotos, que quatro (04) aves em decúbito ventral apresentaram reflexos de insuficiência respiratória como erguer a cabeça e a cauda, provavelmente por diminuição da capacidade de expansão da cavidade torácica pelos músculos peitorais.

6.3 Protocolo do Exame Tomográfico

A proposta inicial de utilização de protocolo de corte tomográfico com incremento de três milímetros baseou-se na informação da possível diferença no tamanho das gônadas, devido a alterações hormonais, podendo variar de alguns milímetros a centímetros. No entanto em alguns animais, as gônadas foram caracterizadas em apenas dois ou três cortes de intervalo (dos 25 realizados), o que poderia comprometer a avaliação das gônadas menores. Assim, optamos por diminuir o intervalo de corte para um milímetro, diminuindo a probabilidade de perda de área de visibilização, reduzindo a região de corte e

do tempo de exposição à radiação, que ficou em média em torno de 25 segundos.

6.4 Característica Gonadal

A análise da TC, apresentou pequena variação nas gônadas masculinas, que não ultrapassaram a medida de poucos milímetros de comprimento (5 a 15mm) e com diâmetro também reduzidos (± 3 mm). Para a gônada feminina foi encontrado uma variação de 10 a 35 mm de comprimento e diferentes diâmetros (6 a 24mm) devido ao formato ovariano em forma de cacho de uva. Corroborando com McDonald (1996), que afirma que o tamanho das gônadas dos psitacídeos de uma forma geral, mesmo com o estímulo sexual não apresentam grandes variações entre as diversas espécies. Ruppley (1999) relatou que a variação no tamanho da gônada pode ser de 10 a 500%, dependendo do período do ano e da estação reprodutiva (influência sazonal dos hormônios) e da condição fisiológica em que cada espécie se encontra.

Uma característica a ser observada é com relação à localização gonadal, pois observou-se uma pequena variação com relação à gônada feminina, que em quatro casos, se localizava ventral, ao lobo médio do rim, diferindo da literatura, pois segundo Ruppley (1999), as aves em geral, apresentam a gônada feminina ventral e cranial ao lobo cranial do rim esquerdo.

6.5 Análise comparativa entre Exames Tomográficos e PCR na identificação gonadal.

Todos os exames realizados foram analisados em corte axial, seguidos de reconstrução sagital e reconstrução dorsal. A análise em corte axial, não foi suficiente para confirmação de todas as observações necessárias em relação às gônadas (localização, posição, tamanho e forma), uma vez que algumas aves apresentavam a disposição da gônada mais caudal e o ovário não se encontrava ventral e cranial ao rim. Porém, em quatro animais, se observou através de reconstruções sagitais que estas, se encontravam mais caudal e ventral ao lobo médio do rim.

Esta disposição anatômica diferenciada pode levar a erros na análise e comparação com resultados da técnica *polimerase chain reaction* (PCR), caso não existisse a possibilidade de reconstruções multiplanares (MPR).

Tais erros podem ocorrer por duas causas: primeira, falta de experiência do avaliador, em relação à técnica e a espécie em análise, e segunda, o espaçamento entre cortes que inicialmente foi realizado com três milímetros de intervalo e que pode ter influenciado na avaliação. Porém nas reconstruções observou-se não ser adequado o espaçamento, sendo assim, foi necessária a repetição com cortes em intervalos de um milímetro, facilitando a reconstrução multiplanar e a avaliação das gônadas por parte do avaliador.

Solucionado as possibilidades de erros, como o treinamento do observador e a diminuição do espaçamento de corte, a análise das tomografias após a reconstrução multiplanar, obteve 100% de acerto quando comparada a técnica “padrão ouro” de PCR.

6.6 Nível de Radiação

Diversos pesquisadores discutem o cuidado a ser tomado na utilização da radiação ionizante como meio de diagnóstico. Quando utilizada sem controle, pode levar a alterações físico-químicas intracelulares, decorrentes dos níveis totais altos da radiação absorvida pelo paciente (BIRAL, 2002). Pelo princípio da otimização (ALARA), o valor das doses individuais e a probabilidade de ocorrência de exposição, possa ser mantido tão baixo quanto razoavelmente exeqüível, considerando os fatores econômicos e sociais. Desta forma, foi realizado um estudo com diminuição do mA para 10 e aumento do kVp para 135 e redução da área de corte para 10mm, considerando o ponto central sobre a região cranial do rim, aonde pudemos observar ser possível a visualização gonadal. A modificação nos valores de kV e mA, assim como o número de cortes, foram capazes de reduzir o desgaste da ampola de 3.471 mAs para 111,4 mAs, bem como uma redução da dose de radiação de 14,38 mGy para 0,529 mGy. Fatores estes que devem ser considerados em futuros experimentos, pois além da diminuição da dose de radiação, existe ainda a economia no desgaste da ampola, determinando um ganho no tempo de vida da mesma.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos durante o projeto de pesquisa, pode-se concluir que:

1. A tomografia computadorizada helicoidal (TC), pode ser utilizada para avaliação gonadal de aves silvestres sem dimorfismo sexual.
2. TC é um meio de diagnóstico indolor, não-invasivo e eficiente para avaliação gonadal de aves em idade reprodutiva.
3. O Posicionamento da ave em decúbito dorsal é eficaz e sem influência da presença de vísceras sobrepondo a região avaliada.
4. Em algumas aves a aferição das gônadas não é possível devido à sobreposição de imagens com os rins.
5. A utilização das reconstruções multiplanares em TC, facilita o detalhamento gonadal e a sua visualização.
6. São necessários estudos para quantificar a radiação absorvida e sua influência, para avaliação da função reprodutiva.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ALLGAYER, M.C.; CZIULIK, M. Reprodução de psitacídeos em cativeiro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.344-350, 2007.

ANDRADE, S.F. *Manual de Terapêutica Veterinária*. 2ª ed. São Paulo, Roca, 2002, p.697.

ANSARI, H. A.; TAKAGI, N.; SASAKI, M. Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytog.and Cell Gen.* v.47, p.185-188, 1988.

BEDROSIAN, B.; LOUTSCH, J.; CRAIGHEAD, D. Using morphometrics to determine the sex of common ravens. *Northwestern Naturalist*. v.89, p.46-52, 2008.

BERRY, C. R. Physical principles of computed tomography and magnetic resonance imaging. In: THRALL, D.E. *Textbook of veterinary diagnostic radiology*. 4 ed., Philadelphia: W.B. Saunders, cap. 3, p. 28-34, 2002.

BIRAL, A.R. *Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos*. 1ª ed. Florianópolis: Insular, 2002. 232p.

BROOKS, S.L. Computed tomography. *Dental Clinic North America*. v. 37, n.4, p.575-90, 1993.

CANNY, C. Gross Anatomy and Imaging of the Avian and Reptilian Urinary System. *Sem. in Avian and Exo. Pet Med.*, v.7, n.2, p. 72-80, 1998.

CARVALHO, A. C. P. História da Tomografia Computadorizada. *Rev. Imagem* v.29, n.2, p. 61-66, 2007.

CARVALHO, M. V. P. *Estudos Citogenéticos na Família Fringillidae (Passeriformes-Aves)*. 1989. Dissertação (Mestrado) em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CASTRO, M.S. *Análise citogenética e biométrica de exemplares mantidos em cativeiro de espécies de Ramphastidae (Piciformes, aves)*. 1997. 97f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, UNICAMP, Campinas.

CERIT, H.; AVANUS, K. Sex identification in avian species using DNA typing methods. *Worlds Poul Sci J.* v. 63, p. 91-99, 2007.

CORREIA, V.C.S.; GARNEIRO, A.D.V.; SANTOS, L.P.; SILVA, R.R.; BARBOSA, M. O.; BONIFÁCIO, H.L.; GUNSKI, R.J. Alta similaridade cariotípica na família emberezidae (aves: passeriformes), *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 25, n. 2, p. 99-111, 2009.

CUBAS, Z.S.; GODOY, S.N. Medicina e Patologia de aves de companhia. In: AGUILAR, R.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.M.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.J. *Atlas de Medicina, Terapêutica e Patologia de Animais Exóticos*. São Caetano do Sul – São Paulo: Interbook, p. 213-264, 2006.

CZISCH, M.; COPPACK, T.; BERTHOLD, P.; AUER, D. P. In vivo magnetic resonance imaging of the reproductive organs in a passerine bird species. *Journal of Avian Biol.*, Copenhagen, v. 32, p. 278-281, 2001.

DIAS, E. A.; OLIVEIRA, C. A. Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunoensaio (RIE) de esteróides sexuais a partir de excretas cloacais. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 43, suplemento, p. 5-11, 2006.

FARFALLINI, D. Tomografia computadorizada. In: PELLEGRINO, F. SURANITI, A. *El libro de neurologia para la practica clínica*. Buenos Aires: Intermedica, p. 475-481, 2003.

FILHO, R.B.; FRANCO, R.W.A.; De NOVAES, A.P.; MAGNANI, F.S.; FELIPPE, P.A.N.; SANTOS, E.F. Sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual via tomografia por ressonância magnética nuclear. Circular Técnica n. 11, *Embrapa Instrumentação Agropecuária*, São Carlos, 2000.

GRANDO, A.P. Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual. 2002. 89f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos.

GRIFFITHS, R. Sex Identification in Birds. *Sem. In Avian and Exo. Pet Med.*, v.9, n 1, p. 14-26, 2000.

GUMPENBERGER, M.; HENNINGER, W. The use of computed tomography in avian and reptile medicine. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, v. 10, n.4, p.174-180, 2001.

HATHCOCK, J.T.; STICKLE, R.L. Principles and concepts of computed tomography. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, v.23, n.2, p.399-415, 1993.

HAWKINS, M.G. Abordagens recentes de anestesia em aves. In: VILANI, R.G.D'.O.C.; SCHMIDT, E.M.S. *Avanços na Medicina de Animais Selvagens: Medicina de aves*. Curitiba – Paraná; Associação Paranaense de Medicina de Animais Selvagens – Grupo Fowler, p. 83-152, 2009.

HOFBAUER, H.; KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. A. Transcutaneous ultrasonography of the avian urogenital tract. *Vet. Rad. & Us*, v. 40, n. 1, p. 58-64, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS RENOVÁVEIS (IBAMA), Portaria 005/91-N, de 25/04/1991, Diário Oficial da União nº 80, 26/04/1991, seção I, p. 7.796. Brasília, 1991.

JONES D.M.; SAMOUR, J.H.; KNIGHT, J.A. et al. Sex determination of monomorphic birds by fibreoptic endoscopy. *Vet. Rec.*, v.15, p.596-598, 1984.

KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. A. Aids to diagnosis. In: COLES, B.H. *Essentials of Avian Med. and Surg.*. Oxford: Blackwell Publishing, cap. 4, 3 ed., p. 56-102, 2007.

LEITE,C.C.; JÚNIOR, E.A.; OTADUY, M.G. Física básica da Tomografia Computadorizada. 2007. Disponível em: <<http://www.hcnet.com.br/inrad>>

LUDDERS, J.W.; SEAMAN, G.C.; ERB, H.N. Inhalant anesthetics and inspired oxygen: implications for anesthesia in birds. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.31, n.1, p.38-41, 1995.

MASSONE, F.; *Anestesiologia Veterinária: Farmacologia e Técnicas*. 4ª ed, São João da Boa Vista-SP, Guanabara Koogan, 2003, 326 p.

MATTA CAMACHO, N.E.; MARTÍN, N.R.; ZÚÑIGA DÍAZ, B.C.; VERA, V. Determinación de sexo en aves mediante herramientas moleculares. *Acta biol. Colomb.*, v. 14, n. 1, p. 25–38, 2009.

McDONALD, S.E. Surgical sexing of birds by laparoscopy. *Calif. Vet.*, v.5, p.16-22, 1982.

McDONALD, S.E. Endoscopy. In: ROSSKOPF JR., W.J.; WOERPEL, R.W. *Diseases of cage and aviary birds*. Baltimore, Williams & Wilkins. p. 699-717, 1996.

McMILLAN M.C. Imaging techniques. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. (Eds). *Avian medicine: principles and application*. Florida: Wingers, cap. 12, p.246-326, 1994.

NETO, F.P.F. Características Gerais das Aves; Manejo, contenção e transporte. In: I CURSO DE OBSERVAÇÃO E CENSO DE AVES, 2006, Bahia.

Anais Eletrônicos... Recife: UFBA, 2006. Disponível em: <<http://geas.unirp.edu.br/Shared%20Documents/aves.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2010.

PAUL-MURPHY, J. AND FIALKOWSKI, J. Anestesia injectable y analgesia de aves. In: GLEED R.D. AND LUDDERS J.W. (Eds.), *Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Companion Animals*. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), 2001. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/Anesthesia_Gleed/paul_es/chapter.asp?LA=2>. Acesso em: 17 Fev. 2010.

PINTO, A.C.B.C.F. Radiologia. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. *Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca, cap. 56, p. 896-919, 2006.

QUESADA, G.A.T.; COSTA, N.P.; OLIVEIRA, H.W.; OLIVEIRA, M.G. Entendendo a tomografia computadorizada. *Rev. Odonto Cient.* 16 (34), 275-82, 2001.

RASO, T.F.; WERTHER, K. Sexagem cirúrgica em aves silvestres. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.2, p.187-192, 2004.

ROCHA, G.T. *Aplicações da citogenética na preservação de animais silvestres*. 1993. 205f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu.

RUPLEY, A.E. *Manual de clínica aviária*. São Paulo, ROCA, p.495-520, 1999.

SANTOS, S.I.C.O.; ELWARD, B.; LUMEIJ, J.T. Sexual dichromatism in the blue-fronted Amazon parrot (*Amazona aestiva*) revealed by multipli-angle spectrometry. *J. of Avian Med. and Surg.*, v. 20, n. 1, p. 8-14, 2006.

SCOLARO, J.A. Sexing Fledglings and Yearlings of Magellanic Penguins by Discriminant. *Analysis of Morphometric Measurements*. Colonial Waterbirds, v.10, n.1, p.50-54, 1987.

SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro, Nova Fronteira. 4ª impressão, 2001.

SINN, L.C. Anesthesiology. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. (Eds). *Avian medicine: principles and application*. Florida: Wingers, cap. 39, p.1066-1080, 1994.

SMITH, C. A. Molecular genetics of avian sex determination and gonadal differentiation. In: JAMIESON, B.G.M. *Reproductive biology and Phylogeny of birds*, Volume 6B. New Hampshire: Edenbridge Ltd. p.470-506, 2007.

STICKLE, R.L.; HATHCOCK, J.T. Interpretation of computed tomographic images. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, v.23, n.2, p.417-435, 1993.

TAYLOR, M. Endoscopic examination and biopsy techniques. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. (Eds). *Avian medicine: principles and application*. Florida: Wingers, cap. 13, p.327-354, 1994.

TIDWELL, A.S. Principles of computed tomography and magnetic resonance imaging. In: THRALL, D.E. *Textbook of veterinary diagnostic radiology*. 5. ed., St. Louis: Saunders Elsevier, p.50-56, 2007.

TOMASULO, A.M. Identificação do sexo em aves da ordem ciconiiformes utilizando a técnica de PCR. 1998. 40f. Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.

TRABALHO CIENTIFICO

9 TRABALHO CIENTIFICO

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Veterinary Radiology & Ultrasound- Instructions for Authors

Editorial Policy

Veterinary Radiology & Ultrasound publishes material of interest to practitioners, specialists and scientists in the fields of veterinary imaging and radiation oncology. Occasionally, invited articles, editorials, letters and invited commentaries will be published. Manuscripts, including figures and tables, must be original and not under consideration by another publication.

Veterinary Radiology & Ultrasound is published bimonthly. The journal reserves the right to reject any material submitted for publication, including advertisements. No responsibility is accepted by the Editor or Associate Editors for the opinions expressed by contributors. The right is reserved to introduce changes to make manuscripts conform to the editorial standards of *Veterinary Radiology & Ultrasound*.

Manuscript Preparation

Manuscripts must be written in English. When necessary, authors should seek the assistance of experienced, English-speaking medical editors before submission. Articles written in substandard English will be returned before peer review.

In preparing manuscripts, authors should follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. Information can be found at <http://www.icmje.org>.

Specific guidelines below supersede those found in the Uniform Requirements.

Prepare the manuscript using a Microsoft Word compatible word processing program. This journal does not accept Microsoft Word 2007 documents at this time. If you are a Word 2007 user, please save your document as an older (.doc) file type. The entire manuscript must be double-spaced using font size 12 with a 1" margin all over. Paginate the entire manuscript starting with title page. Each manuscript line should be distinctly numbered; do **not** begin renumbering on each page.

Title Page: Include the main title of the paper; and the first name (no initials), middle name or initial(s) (optional), last name of all authors. Do **not** list academic degrees or specialty board certification. Specify a **running head** (45 characters) that condenses the subject of the paper. Specify all funding sources (grants, or institutional or corporate support) and the meeting, if any, at which the paper was presented.

An **Abstract** must be included with each manuscript. The abstract should **not** contain more than 250 words (100 words for Imaging Diagnosis submissions), and should **not** be broken down into subheadings. The abstract is more than a summary and should capture the essence of the purpose and findings of the paper.

In the **Text**, any brand name or trademarked product mentioned must be followed by the name, city and state of the manufacturer in parentheses. The use of generic names is preferred to the use of brand names or trademarked names. The text of scientific and methodology articles is usually divided into the following sections: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion. These divisions may be altered for Imaging Diagnosis submissions.

References should be cited in consecutive numeric order at first mention in the text and designated by superscript number. Do **not** include the name of the author of a citation when referring to that work in the text, e.g. In 1999, Smith found.

Reference style is based on an ANSI standard style adapted by the National Library of Medicine. For samples of reference citation formats, authors should consult the National Library of Medicine web site http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus. Consult the following web site for a list of journals indexed <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>

"Unpublished observations" and "personal communications" should **not** be used as references. References listed as "in press" must have been accepted for publication and not merely in preparation or submitted. The author is responsible for the accuracy of all references and must verify them against the original document.

All **Units of Measurement** should be listed in Système Internationale (SI) units. Non-SI units may be used after the SI units but should be placed in parentheses. Use becquerels, not curies, as the unit of activity (1 mCi = 37 MBq).

With the exception of measurements, the journal **discourages** the use of **Abbreviations**. Whenever possible, terms should be spelled out in full rather than being abbreviated.

Tables to summarize data are encouraged. For retrospective clinical studies, detailed tables enumerating specific individual patient criteria or findings will generally **not** be allowed. These clinical data are more useful when summarized and placed into less detailed tables or the text. Number all tables with Arabic numbers consecutively in order of appearance (Table 1). Type each table double-spaced on a separate page. Title should have the first letter of each word as upper case (except prepositions, conjunctions and articles). Every table

must have a caption typed above the tabular material. Symbols for units should be used only in column headings. Do **not** use internal horizontal or vertical lines; place horizontal lines between table caption and column headings, under column headings, and at the bottom of the table (above the footnotes, if any). Indicate normal range for instruments or scales. All abbreviations must be spelled out in footnotes. Use the following symbols in this sequence; *, †, ‡, §, ||, ¶, #, **, ..

Acknowledgments. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. The journal accepts no responsibility for individuals acknowledged without their permission.

Anatomic terminology should conform to the Nomina Anatomica Veterinaria, 5th edition, available for download at http://www.wava-amav.org/Downloads/nav_2005.pdf

Image Acquisition and Nomenclature: Radiographic images should be named according to the direction in which the central ray penetrates the part of interest, from point-of-entrance to point-of-exit. Published guidelines should be used for orientation of radiographic and sonographic images.

For CT and MR images, the following guidelines should be used for image orientation:

· **Head and Spine**

o sagittal plane: cranial (rostral) to left, dorsal at top

o transverse plane: dorsal at top, left to reader's right

o dorsal plane: cranial (rostral) at top, left to reader's right

· **Thorax and Abdomen:** Display images as they were acquired

For MR images, pulse sequence details should be included in the legend of each image. Follow the convention used in the journal "Radiology" for pulse sequence identification.

The amount of detail included regarding image acquisition parameters should be geared to the main message of the manuscript. A template for acquisition parameters relating to various modalities is available for download from the journal's ScholarOne Manuscript site at <http://mc.manuscriptcentral.com/vru> The template will be located under the "Instructions and Forms" link on the login page.

Illustrations

Illustrations must be submitted in .tif format at a resolution of 300 dpi.

A single column illustration will appear at a width of 3.34 inches and a double column illustration will appear with a width of 6.84 inches. Generally, illustrations are printed using single-column width. Authors should keep this final illustration size in mind and use cropping where possible to emphasize the main point.

Do **not** embed the illustrations within the word document.

Each figure must be numbered and cited in consecutive numeric order in the text. If a Figure has multiple parts, eg A, B and C, please refer to each part in the body of the paper rather than to the collective figure.

Figure legends must be included as part of the main word document; do **not** submit figure legends as a separate word document.

Acceptance Criteria

Manuscripts are reviewed for originality, significance, reader interest, composition and adherence to author guidelines. Manuscripts not submitted in accordance with these guidelines will be returned to the author for correction before peer review.

Copyright and Animal Use/Financial Disclosure Forms

Authors who wish to publish any material in Veterinary Radiology & Ultrasound must formally transfer copyright to Blackwell Publishing. The **Copyright Assignment Form** must be signed by the principle author before publication can proceed. A copy of the signed Copyright Assignment Form must be submitted to the Editorial Assistant, Lucinda Ayres, at the time the original manuscript is submitted electronically. This submission can be submitted by FAX or e-mail. The original form should then be mailed to Ms. Ayres at the address noted below.

Authors must also submit a signed **Statement of Animal Use and Financial Disclosure Form**. A copy of the signed form must be submitted to the Editorial Assistant, Lucinda Ayres, at the time the original manuscript is submitted electronically. This submission can be submitted by FAX or e-mail. The original form should then be mailed to Ms. Ayres at the address noted below.

The Copyright Assignment Form and the Statement of Animal Use and Financial Disclosure Form may be downloaded at <http://mc.manuscriptcentral.com/vru>. These forms will be located under the "Instructions and Forms" link on the login page.

Associated Costs for Authors

Following publication, authors will be assessed a page charge of \$50 per printed page that will be billed by the American College of Veterinary Radiology.

Free access to the final PDF offprint or your article will be available via Wiley-Blackwell's Author Services. Please register to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> to register. Paper offprints can be ordered at the author's expense.

Journal Contact Information

The manuscript review process can be followed on the Manuscript Central web site.

For questions about manuscript processing, please contact the **Editorial Assistant**.

Lucinda Ayres, BA, MA

2520 Beechridge Road

Raleigh, NC27608

Phone/FAX 919-510-0560

vetradus@aol.com.

For questions about decisions made on a manuscript, please contact the **Editor In Chief**:

Donald E. Thrall, DVM, PhD

North CarolinaStateUniversity

4700 Hillsborough St.

Raleigh, NC27606

Phone 919-513-6292

FAX, 919-513-6578

don_thrall@ncsu.edu

Trabalho a ser enviado para a revista "Veterinary Radiology & Ultrasound"

**Sex determination of parrots (*Amazona aestiva*) by gonadal assessment
using computed tomography (CT)**

Sexing parrots through computed tomography

Ricardo C. Lehmkuhl, Zara Bortolini, Marcos V. Tranquilim, Carlos R. Teixeira,
Luiz C. Vulcano

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the technique of computed tomography (CT) to visualize and identify the reproductive organs (gonads). Thirty-eight *Amazona aestiva* parrots of unknown sex, older than 5 years of age were used. For anesthesia, ketamine and xylazine were administered. The birds were placed in dorsal recumbency for computed tomography and images were acquired with axial slices at 1-mm collimation. Multiplanar reconstruction (MPR) was performed using dorsal and sagittal slices in order to identify male and female gonads, reaching 100% efficiency as confirmed by the DNA polymorphism technique, so demonstrating the efficacy of the tomography for sexing Psittacidae parrots of the species *Amazona aestiva*.

Index terms: Computed tomography, Psittacidae, Gonads, Sexing, Parrot.

From the Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus Botucatu. Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brazil.

This study was funded by São Paulo Research Foundation – FAPESP - R. Pio XI, 1500 São Paulo, SP 05468-901, Brazil.

Address correspondence and reprint requests to Ricardo Coelho Lehmkuhl, at the above address. E-mail: ricardocoelho1@yahoo.com.br

INTRODUCTION

The Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA), through ordinance number 117 and 118 adopted on 15 October 1997, regulated the breeding of native wild species and commercialization of live and slaughtered animals, as well as parts and products of native fauna, which promoted an increase in the breeding of psittacines in captivity.

The Brazilian Environmental Legislation (Ordinance number.005/91-N) published on 25 April 1991, claims the mating in captivity of those species included in the list of endangered native fauna. Facing the importance of the conservation of these animals and the obligatory character of the law, there is a need for studies to evaluate the causes affecting breeding of captive species. An issue that requires special attention and one of the most critical points regarding wild animals is the difficulty of these individuals in mating under captive conditions.

The study and understanding of the reproductive physiology of these species are very important to conduct breeding, avoid extinction and promote a better management to warrant success during the reproductive cycle. In order to study the reproductive cycle, confident methods of sexing must be implemented. Sexing methods are particularly valuable in animals with no sexual dimorphism, a characteristic shared for more than half of the birds of the world including psittacines¹.

It is important to consider that computed tomography requires ionizing radiation and, maybe so, it is not used for birds in routine; however, CT is a fast, painless non invasive technique, available in several centers of reference worldwide.

MATERIAL AND METHODS

This study has been approved by the Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science – FMVZ – UNESP/ Botucatu – SP, under protocol number 170/2008 and authorized by the System of Authorization and Information on Biodiversity – SISBIO – under number 15.818-1.

The study was performed in the Diagnostic Imaging Center of the FMVZ/UNESP – Botucatu-SP, and was supported for the Center of Medicine and Research on Wild Animals (CEMPAS) of the same institution.

Thirty-eight sound *Amazona aestiva* parrots of unknown sex, older than 5 years of age were used. The animals were weighted and anesthetized using ketamine 20mg/kg, and xylazine hydrochloride 2mg/kg intramuscularly in the chest area. Under anesthesia, animals were placed in dorsal recumbency on an X-ray v-cradle in order to perform the computed tomography. Image acquisition was obtained using a helical computed tomography scanner (SHIMADZU®¹ SCT – 7800 TC). Images were acquired axially at 1-mm collimation and 1-mm interval (1x1), 120 kVp, 150 MA and RF3 filter, with area and slice time of 23 mm. Transversal images were saved as *Digital Imaging and Communications in Medicine* (DICOM) files.

¹ Shimadzu do Brasil comércio Ltda. Av. Marquês de São Vicente nº 1771 – São Paulo – SP

RESULTS

The anesthetic protocol was effective and no extra dose was necessary. After the exam, preliminary evaluation of the slices regarding to image quality as well as sexing without multiplanar reconstruction was performed (Figure 1 and 2).

A better imaging of the areas under study was obtained using either sagittal or dorsal reconstruction, making easier the process of gonadal evaluation.

Differences in size between gonads were also observed, having a variation in testicular longitude from 5 to 15 mm, and from 2 to 5 mm in diameter (mean = 3 mm). Regarding the female gonads, differences in size were higher due to the presence of several ovarian follicles in different stages, so ranging between 10 to 35 mm in longitude, and from 6 to 24 mm in diameter when axially evaluated.

Evaluation using axial slices of the 38 animals initially showed 24 males and 14 females. However, multiplanar reconstruction, lead to different results in 4 animals, showing that the group was formed by 20 males and 18 females, as confirmed using the gold standard test *polimerase chain reaction* (PCR).

DISCUSSION

The critical point on sexing monomorphic birds using computed tomography is the technique to perform the exam, due to conditions such as handling stress, invasiveness, time to obtain the results, and high cost of the procedure. Moreover, it is important to say that computed tomography is still an

underused technique in Brazil, due to the low number of computed tomography scanners available in veterinary medicine.

Time of recovery from anesthesia as well as undesirable symptoms such as excitability, wing flapping and uncoordination, were observed with the initial ketamine/xylazine protocols described by some authors^{2,3,4}. By decreasing the dose of the drugs to 20mg/kg (0.2mL/kg) of ketamine, associated to 2mg/kg (0.1mL/kg) of xylazine, as described in other protocols⁵, it was possible to reduce the average anesthesia from 120 to 50 minutes, with almost no side effects.

In this study we confirmed that the best positioning for psittacines of the species *Amazona aestiva* was dorsal recumbency, once that, during the exam, the birds stood in this position with no alteration of their physiological parameters, allowing excellent visualization of the kidneys and gonads. Some researchers recommend dorsal recumbency, which let the pectoral muscles free and makes breathing easier, due to the lack of diaphragm in birds⁶. These results are different from other studies, which claim that the best positioning for MRI is ventral recumbency⁷. Other authors say that ventilation is compromised in birds when positioned in dorsal recumbency, probably because the weight of the viscera push the abdominal air sacs, reducing the effective volume and leading to respiratory depression⁸.

The initial propose of using a tomographic protocol with 3 mm of increment was based on the information of the possible difference in gonadal size which could vary from few millimeters to centimeters as a consequence of hormonal alterations. However, in some of the birds gonads were observed using only two or three of 25 slices, which could affect the evaluation of the

gonads if smaller. In this case, the protocol was changed to 1 mm collimation, reducing the probability of loss of visualization as well as the time of radiation exposure that was 25 seconds approximately.

The size of the gonads of psittacines does not vary as compared with other species, even under sexual stimulus⁹. Variation between 6 to 30 mm of longitude and several different diameters were found in the female due to the bunch of grapes-like shape of the gonads. Size may vary between 10 and 500%, depending on the seasonal influence of the hormones, reproductive stage and physiological condition of each bird¹⁰.

All of the exams were axially evaluated, followed by sagittal and dorsal reconstruction. The axial analysis alone was ineffective to obtain enough data related to local, position and shape of the gonads, because in some of the birds they were more caudal than normal and in some others, the ovary was neither ventral nor caudal to the kidney. However, through sagittal reconstructions, gonads were visualized slightly caudal and ventral to the mid lobe of the kidney in four birds.

When multiplanar reconstruction is not available, this variable anatomical disposition may lead to mistakes in sexing as compared with the results of the *polimerase chain reaction* (PCR).

These errors may occur because two causes: the first is the lack of experience of the practitioner concerning to the technique and species evaluated; and the second, the interval between slices initially performed each 3 mm, which could influence the image quality. The reconstruction made evident that the initial interval was inadequate. Thus, repetition with 1 mm interval was necessary to facilitate the multiplanar reconstruction and the evaluation of the

gonads by the practitioner. As soon as deficiencies such as practitioner training and interval of the slice were improved, computed tomography analysis after multiplanar reconstruction was 100% effective as compared against the gold standard test of polimerase chain reaction.

Several researchers discuss on the care that should be taken when ionizing radiation is used in imaging diagnosis without regulations, because it may cause intracellular physicochemical alterations as a consequence of the high total levels of radiation absorbed by the patient¹¹. On previous studies, of CT of the pelvis of pregnant women, the mean dose absorbed by the fetuses was 2.5 to 3 mGy. Nevertheless, abortion, congenital anomalies, mental deficiencies or neonatal mortality have not been observed at levels below 50 mGy¹².

Observed in this study, the rate of 14.38 mGy, the index is within human to avoid the occurrence of fetal distress, highly above the level of radiation (2.5 to 3 mGy) absorbed by fetuses. In this case, there are neither parameters nor studies on the mean dose causing damage to the reproductive system on animals, especially in birds.

CONCLUSION

Helical computed tomography (CT) is a painless, non-invasive, efficient and state of the art technique, useful to evaluate the gonads of wild birds with no sexual dimorphism.

REFERENCES

1. Griffiths R. Sex identification in birds. Sem. in Avian and Exo. Pet Med. 2000; 9:14-26.
2. Paul-Murphy J. e Fialkowski J. Anestesia injectable y analgesia de aves. In: Gleed R.D & Ludders J.W. (eds.). Recent advances in veterinary anesthesia and analgesia: Companion animals. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), 2001. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/anesthesia_gleed/paul_es/chapter.asp?la=2>. acesso em: 17 fev. 2010.
3. Massone F. 2003. Anestesiologia Veterinária: Farmacologia e técnicas. 4ª ed, São João da Boa Vista, SP, Guanabara koogan. 326 p.
4. Hawkins M.G. Abordagens recentes de anestesia em aves. In: Vilani R.G.D'.O.C. & Schmidt E.M.S.(Eds). Avanços na medicina de animais selvagens: medicina de aves. Curitiba – Paraná; Associação Paranaense de Medicina de Animais Selvagens – Grupo Fowler, 2009;83-152.
5. Cubas Z.S. & Godoy S.N. Medicina e patologia de aves de companhia. In: Aguilar R., Hernández-divers S.M. & Hernández-divers S.J. Atlas de medicina, terapêutica e patologia de animais exóticos. São Caetano do Sul – São Paulo: Interbook. 2006;213-64.

6. Neto F.P.F. Características gerais das aves; manejo, contenção e transporte. In: I Curso de observação e censo de aves, 2006, Bahia. Anais eletrônicos... Recife: UFBA, 2006. Disponível em: <<http://geas.unirp.edu.br/shared%20documents/aves.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2010.

7. Grando A.P. Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós graduação interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP. 2002;89p.

8. Ludders J.W. Seaman G.C. & Erb H.N. Inhalant anesthetics and inspired oxygen: implications for anesthesia in birds. Journal of the American Animal Hospital Association. 1995;31:38-41.

9. McDonald S.E. Endoscopy. In: Rosskopf Jr. W.J. & Woerpel R.W. Diseases of cage and aviary birds. Baltimore, Williams & Wilkins. 1996;699-717.

10. Rupley A.E. *Manual de Clínica Aviária*. São Paulo, Roca. 1999;

11. Biral A.R. Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos. 1ª ed. Florianópolis: insular. 2002;232p.

12. D'Ippolito G. & Medeiros R.B. Exames radiológicos na gestação. Radiol. Bras. – São Paulo 2005;38:447-450.



FIGURE 1: Male gonads (testicles) are observed (thick arrows) through axial slices under the kidneys (thin arrows).



FIGURE 2: Axial slice demonstrating the female gonad (white circle) ventral to the kidneys (arrows).

ANEXO



Código da solicitação LCVU310809

Exame solicitado para: FMVZ-UNESP

Cliente: Luiz Carlos Vulcano

Código de cliente LCVU

Estabelec.: FMVZ-UNESP-BOTUCATU

Contato: Dr. Luiz Carlos Vulcano

SEXAGEM DE AVES PELO DNA

Técnica utilizada: Polymerase Chain Reaction (P.C.R.) para a amplificação e identificação de marcadores de DNA específicos para cada gênero sexual.

Nº Unigen	Espécie	Identificação do Animal	Tipo de amostra	Resultado
J4440	<i>Amazona aestiva</i>	9080	Sangue Total em Papel	Macho
J4444	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-C-302	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4406	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-676	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4403	<i>Amazona aestiva</i>	(PE) 095	Sangue Total em Papel	Macho
J4436	<i>Amazona aestiva</i>	SOROC 461	Sangue Total em Papel	Macho
J4427	<i>Amazona aestiva</i>	PET 10.5-14281	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4404	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-C-305	Sangue Total em Papel	Macho
J4450	<i>Amazona aestiva</i>	SOROC 463	Sangue Total em Papel	Macho
J4443	<i>Amazona aestiva</i>	AZIBR-418	Sangue Total em Papel	Macho
J4449	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-C-300	Sangue Total em Papel	Macho
J4428	<i>Amazona aestiva</i>	PET 10.5-14303	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4401	<i>Amazona aestiva</i>	SOB 97-212	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4434	<i>Amazona aestiva</i>	MEDIO-01	Sangue Total em Papel	Macho
J4448	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-C-239	Sangue Total em Papel	Macho
J4405	<i>Amazona aestiva</i>	PET 10.5-14304	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4441	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-C-245	Sangue Total em Papel	Macho
J4445	<i>Amazona aestiva</i>	VAT-107	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4419	<i>Amazona aestiva</i>	YURI-033	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4432	<i>Amazona aestiva</i>	AMARELO 03	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4424	<i>Amazona aestiva</i>	PET 10.5-14308	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4431	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-C-290	Sangue Total em Papel	Macho
J4447	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-C-321	Sangue Total em Papel	Macho
J4437	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-248	Sangue Total em Papel	Macho
J4430	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-C-240	Sangue Total em Papel	Macho
J4409	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-125	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4420	<i>Amazona aestiva</i>	SOROC 162	Sangue Total em Papel	Macho
J4425	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-130	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4446	<i>Amazona aestiva</i>	PET 10.5-14177	Sangue Total em Papel	Fêmea



Código da solicitação LCVU310809

Exame solicitado para: FMVZ-UNESP

Cliente: Luiz Carlos Vulcano

Código de cliente LCVU

Estabelec.: FMVZ-UNESP-BOTUCATU

Contato: Dr. Luiz Carlos Vulcano

SEXAGEM DE AVES PELO DNA

Técnica utilizada: Polymerase Chain Reaction (P.C.R.) para a amplificação e identificação de marcadores de DNA específicos para cada gênero sexual.

Nº Unigen	Espécie	Identificação do Animal	Tipo de amostra	Resultado
J4426	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-121	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4423	<i>Amazona aestiva</i>	SOB 97-211	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4429	<i>Amazona aestiva</i>	PET 10.5-18134	Sangue Total em Papel	Macho
J4902	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-C-291	Sangue Total em Papel	Macho
J4442	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-C-237	Sangue Total em Papel	Macho
J4422	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-170	Sangue Total em Papel	Macho
J4402	<i>Amazona aestiva</i>	FPZSP-C-283	Sangue Total em Papel	Macho
J4407	<i>Amazona aestiva</i>	PET 10.5-14292	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4433	<i>Amazona aestiva</i>	PEQUENO 02	Sangue Total em Papel	Fêmea
J4408	<i>Amazona aestiva</i>	PET 10.5-14306	Sangue Total em Papel	Fêmea

Os resultados apresentados referem-se exclusivamente às amostras recebidas no laboratório, cuja responsabilidade de coleta e identificação é do solicitante.

Obs:

São Paulo, 01-set-09

Biologia Molecular
Unigen Tecnologia do DNA LTDA

Antonio Francisco Ferreira Neto
Biólogo Molecular
CRBio 14748/01
Unigen Tecnologia do DNA LTDA