

DETERMINACIÓN DEL SEXO MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

USE OF POLIMERASE CHAIN REACTION FOR SEXING SOUTH AMERICAN CAMELIDS

Vanya Montenegro V.¹, Lenin Maturrano H.^{1,2,3}, Jane C. Wheeler², Raúl Rosadio A.^{1,2}

RESUMEN

Se reporta el desarrollo y optimizaciones de técnicas moleculares (PCR simple, múltiple y semi-anidada) para determinar el sexo de camélidos sudamericanos (CSA) amplificando la secuencia del gen Zinc Finger Protein (ZF). La técnica utilizó ADN obtenido de 28 muestras de sangre de alpacas, llamas y vicuñas, 20 muestras de heces de vicuñas y guanacos conservadas en etanol al 96%, y 22 embriones de alpaca colectados entre 72 y 96 horas postmonta y preservados en etanol. Las muestras de ADN de sangre y heces fueron extraídas usando kits comerciales, y las de embriones aplicando tres métodos (ebullición, proteinasa K y fenol-cloroformo). Una vez optimizada la PCR simple para la detección de los genes ZFY y ZFX, se implementó la PCR múltiple para ADN de sangre y heces y la PCR semi-anidada para ADN de embriones. La técnica de PCR múltiple determinó el sexo correctamente en el 100% de las muestras de ADN sanguíneo, en el 87.5% de muestras de ADN de heces colectadas en 2008 y en el 50% de las muestras de ADN de heces colectadas en 2004 y preservadas durante cuatro años antes del análisis. La prueba de PCR semi-anidada, sin embargo, no pudo ser optimizada.

Palabras clave: ADN, PCR, sexaje molecular, camélidos sudamericanos

ABSTRACT

The objective of this study was to develop a PCR technique to determine the sex of South American camelids (CSA) using Zinc Finger Protein (ZF) sequences from blood and fecal samples, as well as cells from alpaca embryos. A total of 28 alpaca, llama and vicuña blood samples, 20 vicuña and guanaco fecal samples, and 22 alpaca embryos collected between 72 and 96 hours postcopula were used. The fecal and embryo samples were preserved in 96% and 70% ethanol respectively. DNA was extracted from blood and feces using commercial kits. Three methods (boiling, proteinase K and phenol-chloroform) were used to extract DNA from alpaca embryos. Two PCR techniques were developed to

¹ Sección de Biología y Genética Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

² CONOPA – Instituto de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos, Lima

³ E-mail: lenin.maturrano@gmail.com

analyze DNA: multiplex (for fecal and blood sample DNA) and heminested PCR (for embryo cell DNA). The multiplex PCR accurately determined the sex in 100% of the DNA samples extracted from blood, in 87.5% of the samples extracted from fresh feces and in 50% of the 4-year old fecal samples. The heminested PCR, however, could not be optimized.

Key words: DNA, PCR, sexing, South American camelids

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de determinación del sexo son utilizadas en mamíferos, tanto con fines productivos para estimar el sexo de la futura cría en programas de transferencia de embriones, principalmente en bovinos (Thibier y Nimbart, 1995), como con fines de conservación o investigación en aquellas especies en las que no es posible observar el sexo del animal al que pertenece la muestra, como en el caso de animales silvestres como felinos (Pilgrim *et al.*, 2005) o primates (Villensen y Fredsted, 2006). De las técnicas reportadas para determinar el sexo en mamíferos, la técnica de PCR es la más sensible, sencilla y rápida. La técnica se basa en la amplificación de segmentos de un gen presente sólo en el cromosoma Y, como el gen SRY (Pilgrim *et al.*, 2005), o en la amplificación de segmentos de ADN presentes en ambos cromosomas sexuales pero con mutaciones diferenciales, como en el caso del gen Zinc Finger Protein (ZF) (Aasen y Medrano, 1990; Prithiviraj y Melnic, 2001).

El sexaje molecular, en muestras no invasivas, se emplea en varias especies de animales de vida silvestre (Vidya *et al.*, 2003; Pilgrim *et al.*, 2005; Villessen y Fredsted, 2006), y en muestras de sangre y tejidos con la finalidad de aplicarlas en el sexaje de embriones de especies domésticas (Pomp *et al.*, 1995; Phua *et al.*, 2003; Lemos *et al.*, 2005). Similares técnicas han sido utilizadas en ADN sanguíneo de llamas y alpacas amplificando el gen SRY (Pomp *et al.*, 1995; Arias y Huanca, 2009); sin embargo, no existen reportes de su utilización en muestras de ADN fecales ni embrionarias.

En el Perú se han iniciado estudios de diversidad genética en poblaciones de vicuñas y guanacos utilizando muestras de heces. La caracterización de estas poblaciones silvestres requiere en muchos casos informaciones sobre proporciones de machos y hembras, por lo que es necesario disponer de una prueba de sexaje molecular optimizada. En el presente estudio se reportan optimizaciones de técnicas de PCR para el sexaje molecular, inicialmente en muestras sanguíneas y, posteriormente, en ADN de heces y embriones, amplificando segmentos del gen Zinc Finger protein (ZF) utilizando tres cebadores específicos para camélidos sudamericanos diseñados por investigadores del Instituto de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos - CONOPA (Montenegro *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Muestras de ADN

Extracción de ADN de sangre

Se utilizaron 28 muestras de sangre extraídas mediante punción de la vena yugular, utilizando tubos al vacío con K3 EDTA al 15%, obtenidas de 20 alpacas adultas de la Estación Experimental del Centro de Investigación IVITA (Marangani, Cusco) y de ocho vicuñas (Cuadro 1) recolectadas con autorizaciones 016-2004-INRENA-IFFS-DCB, 021-2004-INRENA-IFFS-DCB, 11 C/C-2004-INRENA-IANP, 12 C/C-2004-INRENA-IANP y 057-2008-INRENA-IFFS-DCB. Para la extracción del ADN se utilizó la prueba "Promega Wizard DNA Purification

Cuadro 1. Número y características de las muestras de ADN obtenidas de camélidos sudamericanos

	ADN sanguíneo	ADN de heces		ADN embrionario
		Heces colectadas (2004)	Heces colectadas (2008)	
Alpacas	10 (5 H ¹ y 5 M ¹)		4 (2 H y 2 M) ^c	22
Llamas	10 (5 H y 5 M)			
Vicuñas	8 (4 H y 4 M)	4 (1 H y 3 M) ^b	2 (1 H y 1 M) ^c	
Guanacos		8 (2 H y 6 M) ^a	2 M ^c	
Total:	28 (14 H y 14 M)	12 (32 H y 4 M)	8 (2 H y 6 M)	22

^a Heces obtenidas en abril de 2004

^b Heces obtenidas en diciembre de 2004

^c Heces colectadas en el Patronato del Parque de las Leyendas Felipe Benavides Barreda (PATDAL), Lima, en febrero de 2008

¹ H: hembra; M: macho

kit” (Promega, Madison, USA), siguiendo las instrucciones del laboratorio comercial. Estas muestras de ADN fueron utilizadas como patrón en el proceso de optimización y desarrollo de las técnicas de PCR empleadas en el estudio.

Extracción de ADN de heces

Se trabajó con 20 muestras de heces de 12 vicuñas y 8 guanacos (Cuadro 1), obtenidas con las autorizaciones arriba indicadas. Las heces de vicuñas se obtuvieron directamente del recto del animal. Las heces de guanacos se colectaron de las letrinas inmediatamente después de observar defecar al animal y constatar el sexo con la ayuda de binoculares. Las muestras fueron transportadas y conservadas en etanol absoluto a temperatura ambiente y el ADN fue extraído usando la prueba comercial QIAamp Stool Mini Kit (QIAGEN).

Extracción de ADN de embriones

Se utilizaron animales del Centro de Investigación IVITA, en Marangani, Cusco. Se colectaron 22 embriones de alpaca (14 co-

lectados 72 horas postmonta y 8 a las 96 horas postmonta) mediante la técnica quirúrgica descrita por Novoa *et al.* (1999). Los embriones fueron colocados en microtubos de polietileno conteniendo 200 µL de etanol al 70% a 4 °C y transportados a la unidad de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. El etanol fue eliminado mediante pasajes del embrión en agua ultrapura y el ADN fue extraído tres semanas después de la colección empleando tres métodos aplicados al azar (ebullición, proteinasa K y fenol-cloroformo).

Cuantificación de ADN

La concentración y la tasa de pureza del ADN extraído de todas las muestras fueron determinadas mediante espectrofotometría a 260 nm y 280 nm. La calidad del ADN fue verificada mediante electroforesis en un gel de agarosa.

Optimización de las Técnicas de PCR

Las muestras de ADN sanguíneo fueron utilizadas inicialmente para optimizar la

Cuadro 2. Mezcla estándar y ciclos utilizados en el proceso de optimización de la PCR simple de ZFX-Y, PCR simple de ZFY, PCR múltiple y PCR semianidada para muestras de ADN de camélidos sudamericanos

	ZFX-Y	ZFY	Múltiple	Semianidada
MgCl ₂ (mM) ^a	1.4	1.98	2.5	
ADN (pg) ^d	4,000	20,000	50,000	0.5 (μL) ^e
BSA (μg/μL)	1.2	0.8	1	
Formamida (%)	---	---	1	
Cebador ZFX 2 (pmol) ^c	12.5	12.5	25	
Cebador ZFX 4 (pmol) ^c	12.5	12.5	25	
Cebador ZFY (pmol) ^c			25	
dNTPs (mM) ^b	0.2	0.16	0.2	
Taq polimerasa (U) ^a	1	1	0.5	
Buffer de PCR (X) ^a	0.9	0.8	1	
Volumen final (μL)	21.7	25.2	20	12
Ciclos	95 °C x 5'; 35 (95 °C x 30'', 56 °C x 45'', 72 °C x 45''), 72 °C x 5'	95 °C x 5', 35 (95 °C x 30'', 52 °C x 45'', 72 °C x 45''), 72 °C x 5'	95 °C x 5', 35 (95 °C x 30'', 52 °C x 45'', 72 °C x 45''), 72 °C x 5'	

^a Promega, Madison, USA; ^b Gibco; ^c Sigma Genosis; ^d Cantidades totales en la mezcla, ^e Cantidad de producto de la primera PCR

técnica de PCR simples para los genes ZFX y ZFY en formas individuales, para luego desarrollar y estandarizar un PCR múltiple y semianidado. Después de la estandarización para la amplificación de ambos genes en muestras sanguíneas, se procedió a extrapolar la técnica a muestras de ADN fecales y embrionarios.

El proceso de optimización en ADN de sangre, consistió en amplificar segmentos de diferentes tamaños del gen ZF altamente conservado en mamíferos, utilizando tres cebadores (Aasen y Medrano, 1990). Los

protocolos utilizaron los cebadores ZFX2 y ZFX4 para amplificar un segmento de 250 pares de bases (pb) presente en ambos cromosomas sexuales (ZFX y ZFY), y un tercero ZFY2 de reversa utilizado conjuntamente con el cebador ZFX2 para amplificar un segmento de 130 pb, presente solamente en el cromosoma Y (ZFY) (Montenegro *et al.*, 2007).

Durante el proceso de optimización se trabajó con una mezcla de reactivos estándar (Cuadro 2) y se evaluaron ocho parámetros en forma individual. De esta forma, solo va-

Cuadro 3. Condiciones evaluadas en el proceso de optimización de la PCR simple de ZFX-Y, PCR simple de ZFY, PCR múltiple y PCR semianidada

	Simple de ZFX-Y	Simple de ZFY	Múltiple	Semianidada ^a
Temperatura de alineación (°C)	58, 60, 62 y 64	48, 50, 52 y 54	49, 51, 53 y 55	52, 54, 56, 58 y 60
Concentración de cloruro de magnesio (mM)	1, 1.4, 1.8, 2.3 y 2.7	1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8 y 3.2	2.0, 2.5, 3.0 y 3.5	
Cantidad de ADN molde (pg)	20, 50, 200, 400 y 200	20,000 y 40,000	20,000, 50,000 y 100,000	0.12, 0.25, 0.5, 1 y 2 μL ^b
Cebador ZFX 2 (pmol)	--	--	12.5, 25 y 50	
Cebador ZFX 4 (pmol)	--	--	25, 75 y 50	
Cebador ZFY 2 (pmol)	--	--	25 y 50	
BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.5, 0.8, y 1.2	0.5, 0.8, y 1.2	0.5, 1, 1.5 y 2	
Formamida (%)			1, 2, 3 y 4	1, 2, 3 y 4

^a El primer PCR se llevó a cabo con las mismas condiciones que para ZFX

^b Cantidad del producto de la primera PCR

rió el parámetro a evaluar en el orden que se presentan en el Cuadro 3, quedando constantes los demás parámetros. Todas las reacciones incluyeron un control negativo (agua ultrapura en vez de ADN) y se utilizó un termociclador Applied Biosystems 2720. Una vez optimizada la PCR simple con muestras de sangre, se hizo lo mismo para desarrollar el PCR múltiple y posteriormente la anidada. Una vez optimizada la técnica de PCR múltiple se evaluaron todas las muestras de sangre y heces.

Resolución de los Fragmentos Amplificados

Los productos de cada PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2% en solución tampón TBE 0.5X (Tris, Acido Bórico, EDTA), en una cámara de electroforesis horizontal junto a un marcador de peso molecular, para determinar el tamaño aproximado de los fragmentos amplificados. Los productos de PCR fueron teñidos con bromuro de etidio, visualizados en un transiluminador y fotografiados con una cámara Polaroid (DS 34).

Cuadro 4. Cantidad y características de las muestras de ADN extraídas

	Muestras	Concentración de ADN (ng/ μ L)	Pureza	Características
ADN sanguíneo	28	123.95 (39-211)	>1.8	Mínima presencia de ADN degradado
ADN de heces	20	100.06 (1-265)	0.2-1.7	Moderada a máxima presencia de ADN degradado
ADN de embriones ¹	22	---	---	---

¹ No se obtuvo ADN

Cuadro 5. Condiciones óptimas para la PCR simple de ZFX-Y, PCR simple de ZFY, y PCR múltiple

	ZFX-Y	ZFY	Múltiple
MgCl ₂ (mM)	2.7	1.6	2.5
ADN (ng)	>0.1	25	20
BSA (μ g/ μ L)	0.8	1.2	1
Formamida (%)	---	---	1
Cebador ZFX 2 (pmol)	12.5	12.5	50
Cebador ZFX 4 (pmol)	12.5	12.5	12.5
Cebador ZFY 2 (pmol)	---	---	25
dNTPs (mM)	0.2	0.16	0.2
<i>Taq</i> polimerasa (U)	1	1	0.5
Buffer de PCR (X)	0.9	0.8	1
Volumen final (μ L)	21.7	25.2	20
Ciclos	95 °C x 5'; 35 (95 °C x 30'', 64 °C x 45'', 72 °C 45''), 72 °C x 5'	95°C x 5'; 35 (95 °C x 30'', 52 °C x 45'', 72 °C 45''), 72 °C x 5'	95 °C x 5'; 35 (95 °C x 30'', 53 °C x 45'', 72 °C 45''), 72 °C x 5'

Cuadro 6. Resultados de la determinación del sexo de camélidos sudamericanos mediante PCR múltiple utilizando ADN de heces

Coincidencia de sexo mediante PCR con sexo fenotípico	Muestras colectadas hace 4 años	Muestras frescas	Total
Positivo	6 (50%)	7 (87.5%)	13 (65%)
Negativo	6 (50%)	1 (12.5%)	7 (35%)
Total	12 (100%)	8 (100%)	20 (100%)

Interpretación de Resultados

Los animales cuyas muestras presentaron solamente la amplificación de un producto de PCR de 250 pb (ZFX-Y) fueron diagnosticados como hembras y aquellos que mostraron dos amplicones simultáneos, uno de 250 pb (ZFX-Y) y otro de 130 pb (ZFY), fueron diagnosticados como machos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ADN extraído de sangre de alpacas y llamas tenía una alta concentración (45-201 ng/ μ L) y buena tasa de pureza (>1.8 y mínima presencia de degradación), corroborando similares características reportadas para otras especies (Chu *et al.*, 2006). El ADN sanguíneo de animales silvestres fue, igualmente, de alta concentración (39-211 ng/ μ L) y buena pureza (>1.8) (Cuadro 4).

La concentración y pureza de ADN de muestras fecales varió dependiendo del tiempo recolectado. Las cuatro muestras frescas de alpacas obtenidas en 2008 tuvieron concentraciones mayores (15-265 ng/ μ L) comparadas con las obtenidas en el 2004 y preservadas durante cuatro años en el laboratorio antes de la extracción (1-172 ng/ μ L). Todas las

muestras sin distinción de fecha mostraron el ADN degradado (datos no mostrados). La calidad del ADN extraído de heces fue semejante a lo encontrado en ADN de heces obtenido en humanos (Deuter *et al.*, 1995), elefantes (Vidya *et al.*, 2003), felinos (Pilgrim *et al.*, 2005) y primates no humanos (Villensen y Fredsted, 2006). La degradación posiblemente se deba a que el ADN, proveniente de las células exfoliadas de la mucosa del colon, se mezcle con la flora intestinal y se exponga al medio ambiente una vez expulsado. La baja tasa de pureza se debería, además, a la gran cantidad de residuos (polisacáridos complejos, lípidos y proteínas) presentes en la materia fecal, que es difícil eliminar durante la extracción (Wasser *et al.*, 1997; Nsubuga *et al.*, 2004). La baja cantidad y degradación de ADN observada pudo deberse a la escasa presencia de células epiteliales descamadas (Deuter *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 2006), lo que motivó la necesidad de incrementar la cantidad de ADN molde en la PCR múltiple.

Se verificó la presencia de los embriones antes de la extracción pero no se logró detectar ADN, probablemente debido a la baja cantidad de células en los embriones utilizados o la capacidad de extracción de las técnicas utilizadas; sin embargo, no existen reportes al respecto.

Las exitosas amplificaciones de los segmentos individuales ZFX y ZFY en PCR simples, así como la detección conjunta de ambos segmentos ZFX y ZFY en PCR múltiple se detallan en el Cuadro 5. La amplificación óptima del ZFY fue conseguida utilizando temperatura de alineación de 52 °C y concentraciones de Mg de 1.6 mM y seroalbúmina bovina (BSA) de 1.2 µg/µL que permitieron amplificar un buen producto en muestras conteniendo hasta 25 ng de ADN. Para amplificar óptimamente el segmento ZFX-Y se necesitó 64 °C de temperatura con concentraciones de Mg de 2.7 mM y BSA de 0.8 µg/µL necesarios en la obtención de productos visibles en muestras con más de 0.1 ng de ADN.

Las condiciones evaluadas para optimizar la PCR múltiple determinó que para amplificar ópticamente ambos segmentos se necesitaron utilizar las siguientes condiciones: 53 °C de temperatura de alineación, 2.5 mM de Cl₂Mg, 1% de BSA, 1% de formamida, 50 pmol del cebador ZFX2, 12.5 pmol de ZFX4 y 25 pmol de ZFY2 (Cuadro 5). Con estas condiciones se logró obtener buenos productos en concentraciones de ADN de hasta 20 ng.

Debe indicarse que a pesar de lograr amplificar el segmento de ZFY, en la técnica de PCR anidada, utilizando como molde el segmento amplificado de ZFX-Y, no se logró amplificar el segmento ZFY en forma consistente en una primera ronda, y algunas veces incluso con falsos resultados. Estas inconsistencias en los resultados pueden explicarse por la alineación inespecífica del cebador ZFY2 al cromosoma X, altamente concentrado en el ADN, después de una primera amplificación en la técnica de PCR anidada, o producto de contaminaciones altamente sensibles en la PCR anidada (García-Quintanilla *et al.*, 2000).

La optimización de la PCR múltiple permitió disminuir la cantidad de falsos negativos corroborando previas observaciones reportadas por Ortega *et al.* (2004). La amplificación de solamente un segmento en una

PCR simple puede sugerir erróneamente el sexaje como hembra, ya que la no amplificación del segmento propio del macho podría ser consecuencia de la degradación de la muestra (problema frecuente en ADN extraído de heces), y no necesariamente ser una muestra perteneciente a una hembra (Aasen y Medrano, 1990; Prithiviraj y Melnick, 2001; Pilgrim *et al.*, 2005). La técnica de PCR múltiple desarrollada en el presente estudio permite la amplificación de segmentos específicos de cada cromosoma sexual, que al ser de pequeño tamaño facilita el uso en muestras degradadas como el ADN obtenido de heces (Villensen y Fredsted, 2006). Consecuentemente, la utilización de la PCR múltiple en el sexaje molecular tiene una potencial ventaja frente al método propuesto por Arias y Huanca (2009), quienes sustentan el sexaje en la detección de una sola banda diagnóstica. La aplicación de la técnica de PCR múltiple en ADN sanguíneo determinó que el sexaje molecular concordó con el sexo fenotípico en el 100% de las muestras (Fig. 1, Cuadro 6), coincidiendo con lo encontrado por García-Muro *et al.* (1996) en caninos y Lemos *et al.* (2005) en bovinos, debido a la alta calidad y cantidad del ADN obtenido en estas muestras.

Los porcentajes de la correcta identificación de sexo mediante la técnica de PCR múltiple en muestras de ADN fecal (Cuadro 6) fueron similares a los obtenidos por otros investigadores (Wasser *et al.*, 1997; Pilgrim *et al.*, 2005) quienes identificaron correctamente el sexo en el 50-100% de las muestras usando ADN de heces de osos y felinos, respectivamente. El amplio margen de sensibilidad de la prueba en muestras de heces tal vez sea producto de la baja concentración de ADN y presencia de inhibidores de PCR y ADN degradado, lo cual es frecuentemente observado en muestras de ADN fecales. Por otro lado, las fallas en la amplificación en algunas muestras fecales en el estudio (Fig. 2), podrían deberse a factores tales como método de colección y conservación (etanol al 70%), protocolo de extracción (QIAGEN QIAamp® Stool Mini Kit), condiciones

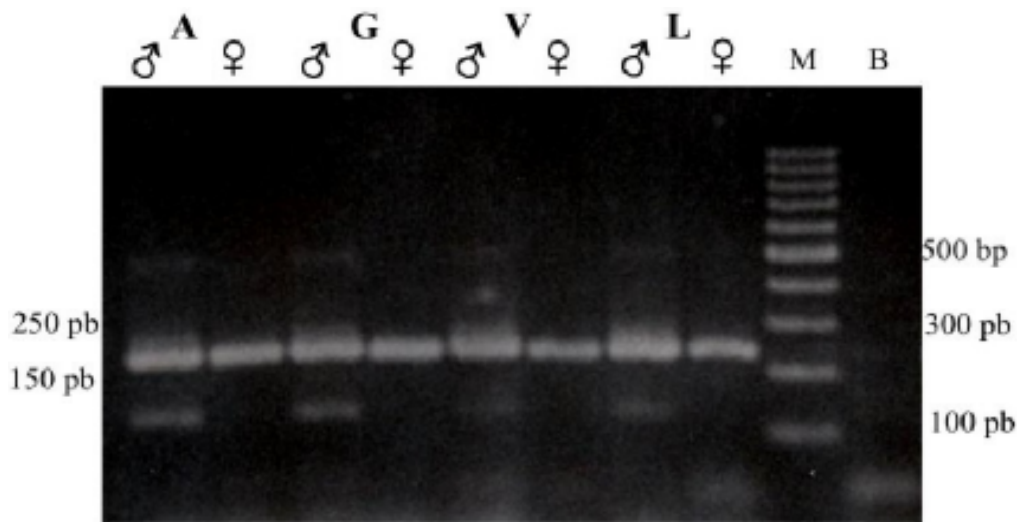


Figura 1. PCR múltiple utilizando muestras de ADN extraído de sangre de camélidos sudamericanos. V = vicuña; G = guanaco; A = alpaca; L = llama; ♀ = hembra; ♂ = macho; M = marcador de 100 pb; B = blanco de PCR

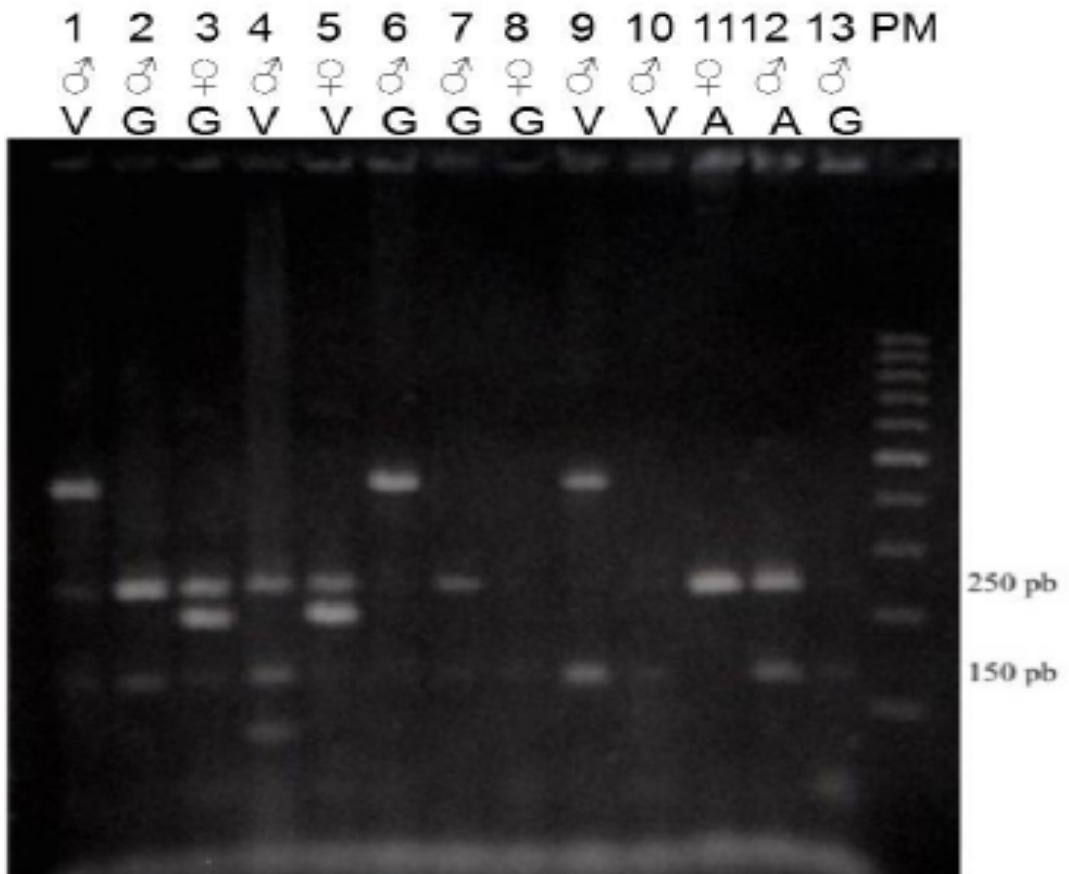


Figura 2. PCR múltiple utilizando muestras de ADN extraído de heces de camélidos sudamericanos silvestres. V = vicuña; G= guanaco; A = alpaca; ♀ = hembra; ♂ = macho; PM = marcador de 100 pb

medioambientales en la época de colección, la dieta y la especie animal (Nsubuga *et al.*, 2004; Chu *et al.*, 2006). Sin embargo, en el presente estudio, la diferencia de éxito en muestras colectadas en 2004 y 2008 (Cuadro 6), evidencian la influencia del tiempo transcurrido desde la colección de las muestras a la fecha de extracción y/o del método de conservación, como factores negativos para la amplificación de segmentos de ADN determinantes de sexo (Wasser *et al.*, 1997; Nsubuga *et al.*, 2004).

La técnica de PCR múltiple determinó el sexo correctamente en el 100% de las muestras de ADN sanguíneo, en el 87.5% de muestras de ADN de heces colectadas en 2008 y en el 50% de las muestras de ADN de heces colectadas en 2004 y preservadas durante cuatro años antes del análisis.

CONCLUSIÓN

Se desarrolló una técnica de PCR múltiple que permitió determinar el sexo de camélidos sudamericanos a partir de muestras de sangre. Esta prueba podría ser aplicada con un grado de éxito de 87.5% en muestras frescas de heces de camélidos sudamericanos silvestres.

LITERATURA CITADA

1. **Aasen E, Medrano JF. 1990.** Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 8: 1279-1281.
2. **Arias N, Huanca W. 2009.** Un método para el sexaje por ADN de alpaca amplificando el gen SRY mediante PCR. *Rev Inv Vet, Perú* 20: 203-207.
3. **Chu J, Lin Y, Wu H. 2006.** Applicability of non invasive, sampling in population genetic study of Taiwanwanese machaques (*Macaca cyclopis*). *Taiwania* 51: 258-265.
4. **Deuter RS, Pietsch, Hertel S, Müller O. 1995.** A method for preparation of fecal DNA suitable PCR. *Nucleic Acids Res* 23: 3800-3801.
5. **García-Muro E, Aznar MP, Rodellar C, Zaragoza P. 1996.** Sex-specific PCR/RFLPs in the canine ZFY/ZFX loci. *Anim Genet* 28: 150-158.
6. **García-Quintanilla A, García L, Tudó G, Navarra M, González J, Jiménez MT. 2000.** Single-tube balanced heminested PCR for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in smear-negative samples. *J Clin Microbiol* 38: 1166-1169.
7. **Lemos DC, Lopes Ríos AF, Caetano LC, Lobo RB, Vila RA, Martelli L, Takeuchi PL, Ramos ES. 2005.** Use of the TSPY gene for sexing cattle. *Genet Mol Biol* 28: 117-119.
8. **Montenegro V, Maturrano L, Wheeler JC, Rosadio R. 2007.** Desarrollo de una técnica rápida mediante PCR para determinación del sexo en camélidos sudamericanos domésticos. En: I Congreso Nacional de Reproducción y Mejoramiento Genético de Camélidos Sudamericanos. Huancavelica, Perú.
9. **Novoa C, Franco E, García W, Pezo D. 1999.** Dosis de gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. *Rev Inv Vet, Perú* 10(1): 48-53.
10. **Nsubuga AM, Robbins MM, Roeder AD, Morin PA, Boesch SC, Vigilant L. 2004.** Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved simple storage method. *Mol Ecol* 13: 2089-2094.
11. **Ortega J, Franco M, Adams BA, Ralls K, Maldonado JE. 2004.** A reliable noninvasive method for sex determination in the endangered San Joaquin kit fox (*Vulpes macrotis mutica*) and other canids. *Conserv Genet* 5: 715-718.
12. **Phua A, Abdullah R, Mohamed Z. 2003.** A PCR based sex determination method for possible application in caprine gender selection by simultaneous

- amplification of the *Sry* and *Aml-X* Genes. *J Reprod Dev* 49: 307-311.
13. **Prithviraj F, Melnick J. 2001.** Molecular sexing eutherian mammals. *Mol Ecol Notes* 1: 350-353.
14. **Pilgrim KL, Mckeelvey KS, Riddle AE, Schwartz MK. 2005.** Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. *Mol Ecol Notes* 5: 60-61.
15. **Pomp D, Good BA, Geiser RD, Corbin CJ, Conley AJ. 1995.** Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day 10 or 11 pig embryos. *J Anim Sci* 73: 1408-1415.
16. **Thibier M, Nimbart M. 1995.** The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43: 71-80.
17. **Vidya TNC, Roshan V, Aravazhagan C, Sukumar R. 2003.** Application of molecular sexing to free-ranging Asian elephant (*Elephas maximus*) populations in southern India. *Curr Sci India* 85: 1074-1077.
18. **Villesen P, Fredsted T. 2006.** Fast and non-invasive PCR sexing of primates: apes, old world monkeys, new world monkeys and Strepsirrhines. *BMC Ecology* 6: 8. [Internet]. Available in: <http://www.biomedcentral.com/1472-6785/6/8>
19. **Wasser SK, Houston CS, Koehler GM, Cadd GG, Fain R. 1997.** Techniques for application of faecal DNA field studies of Ursids. *Mol Ecol* 6: 1091-1097.