

CONSERVAÇÃO, USO E MELHORAMENTO DE GALINHAS CAIPIRAS



DÉBORA ARAÚJO DE CARVALHO
JOSÉ LINDENBERG ROCHA SARMENTO
MARCOS JACOB DE OLIVEIRA ALMEIDA
(ORGANIZADORES)

Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Prof. Me. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
C755	<p>Conservação, uso e melhoramento de galinhas caipiras / Organizadores Débora Araújo de Carvalho, José Lindenberg Rocha Sarmento, Marcos Jacob de Oliveira Almeida. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-5706-003-2 DOI 10.22533/at.ed.032202704</p> <p>1. Galinhas – Criação – Brasil. 2. Aves – Genética. I. Carvalho, Débora Araújo de. II. Sarmento, José Lindenberg Rocha. III. Almeida, Marcos Jacob de Oliveira.</p> <p style="text-align: right;">CDD 636.51</p>
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

COLETA DE SANGUE E EXTRAÇÃO DO DNA DE AVES: UMA REVISÃO

Data de aceite: 19/03/2020

Artur Oliveira Rocha

Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/8991807731249154>

Débora Araújo de Carvalho

Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/5713516699845140>

José Lindenberg Rocha Sarmiento

Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/1991742176699922>

Abigail Araújo de Carvalho

Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/2914794424016683>

Marcos Jacob de Oliveira Almeida

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Meio-Norte (Embrapa MN) Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/2068380243699918>

Bruna Lima Barbosa

Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/1399649319998684>

Luciano Silva Sena

Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/2693515715136985>

Geandro Carvalho Castro

Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/9073517176001063>

Joselice da Silva Pereira

Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/3895166327973760>

Marcos David Figueiredo de Carvalho

Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro
Petrônio Portella
Teresina, Piauí
<http://lattes.cnpq.br/3825794988148916>

RESUMO: Aves de raças nativas criadas em sistema caipira atualmente demonstram grande potencial produtivo, o que torna sua criação uma atividade altamente viável para pequenas propriedades rurais. Neste sentido, o melhoramento genético destas aves, auxiliado pela biologia molecular, ganha a cada dia mais visibilidade e aplicações para intensificar a sua

produção. Por consequência, obstáculos da seleção fenotípica podem ser parcialmente eliminados, com o uso de marcadores moleculares, resultando em uma seleção mais precoce e de custo mais baixos. Duas etapas importantes no processo de identificação de indivíduos geneticamente superiores são a coleta de material biológico e a obtenção de DNA. Contudo, poucos são os relatos e estudos sobre a coleta desses materiais, bem como as particularidades encontradas na extração do ácido desoxirribonucleico e seus protocolos em aves. Neste capítulo é apresentada uma revisão de literatura sobre as formas de coleta de material biológico (sangue) e extração de DNA, bem como as implicações destas na prática laboratorial e na qualidade e quantidade final do material genético, no contexto das aves. Com isto, objetivou-se otimizar e esclarecer estas práticas à luz da literatura, para futuros trabalhos com uso de informação genômica aplicadas, por exemplo, em aves de raças locais.

PALAVRAS-CHAVE: Galinhas Caipiras, Material Biológico, PCR, Raça Nativa.

BLOOD COLLECTION AND BIRD DNA EXTRACTION: A REVIEW

ABSTRACT: Currently, birds of native breeds reared in free-range systems demonstrate great productive potential, which makes this activity highly viable for small rural properties. In this sense, the genetic improvement of these birds, aided by molecular biology, gains each day more visibility and applications to intensify their production. Consequently, obstacles to phenotypic selection can be partially eliminated with the use of molecular markers, resulting in earlier selection and lower costs. Two important steps in the process of identifying genetically superior individuals are the collection of biological material and the DNA obtainment. However, there are few reports and studies on the collection of these materials, as well as the particularities regarding the extraction of deoxyribonucleic acid and its protocols, in birds. In this chapter we present a literature review on the ways of collection of biological material (blood) and DNA extraction, as well as their implications for laboratory practice and the final quality and quantity of genetic material applied to the context of birds. Thus, we aimed to optimize and clarify these practices in the light of the literature, for future works with the use of genomic information applied, for example, to birds of native breeds.

KEYWORDS: Free-range Chickens, Biological Material, Native Breed, PCR.

1 | INTRODUÇÃO

A avicultura praticada com aves de raças nativas, que são criadas em sistema tradicional a campo, tinha um forte conceito de uma criação sem cuidados sanitários, nutricionais e até mesmo de ambiência, o que deixava essa atividade com visão de baixa produtividade. Contudo, atualmente, as aves criadas em sistema caipira demonstram grande potencial produtivo e possuem dupla potencialidade (carne e

ovos), que podem ser explorados pelos criadores (SANTANA FILHO; LIMA, 2012).

Desta forma, a avicultura caipira com raças nativas torna-se uma atividade viável, principalmente para pequenas propriedades rurais, em que pode representar uma fonte de alimento e renda para as famílias. Estas famílias podem explorar uma fatia mais específica do mercado, que busca por produtos de origem conhecida, de produção tradicional e com boas práticas de bem-estar (TAKAHASHI, 2003; ABREU, VIEIRA JUNIOR & COSTA, 2004), além do sabor diferenciado característico desse tipo de aves.

Pesquisas que envolvem o melhoramento genético de galinhas de raças nativas ganham a cada dia mais visibilidade e aplicações, com o objetivo de desenvolver aves nativas, já adaptadas, para proporcionar aumento nos índices produtivos via seleção de animais geneticamente superiores (BOELLING et al., 2003; SAVINO et al., 2007). Para intensificar o melhoramento genético, a biologia molecular pode ser empregada com intuito de aumentar a acurácia dos métodos quantitativos clássicos. Por exemplo, através da seleção assistida por marcadores, é possível melhorar consideravelmente a eficiência dos programas de melhoramento animal (MOKHTARZADEH et al., 2009).

Alguns obstáculos da seleção fenotípica podem ser parcialmente eliminados com o uso de informações moleculares, resultando em uma seleção mais precoce e de custos mais baixos, devido à ampla popularização dos marcadores (DEKKERS; HOSPITAL, 2002). A coleta de material biológico e a obtenção de DNA de boa qualidade representam duas etapas importantes no processo de identificação dos genótipos superiores. Contudo, ainda há poucos relatos e estudos sobre a coleta desses materiais, bem como sobre as particularidades encontradas nas bancadas de laboratório no momento da extração do DNA de aves. O que existe em grandes quantidades são protocolos que permitem a obtenção de DNA de diferentes tipos de amostras, constatando que há variações no custo e tempo de obtenção (FUNGARO & VIEIRA, 1998).

Neste capítulo, apresentamos uma revisão de literatura sobre as formas de coleta de material biológico (sangue) e extração de DNA, bem como as implicações destas na prática laboratorial e na qualidade e quantidade final do DNA, aplicadas ao contexto das aves. Com isso, objetiva-se otimizar e esclarecer estas práticas à luz da literatura, para futuros trabalhos com uso de informação genômica em aves de raças nativas.

2 | COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE EM AVES

A coleta de uma amostra de material biológico de alta qualidade é uma das partes mais importantes do processo de genotipagem do animal, de modo que a

utilização de técnicas e cuidados especiais é essencial (CLARK; BOARDMAN; RAIDAL, 2009a).

Nas aves, tem-se uma dificuldade a mais na coleta de sangue, devido ao seu pequeno porte e, por consequência, menor volume sanguíneo. A quantidade de sangue a se coletar depende diretamente do tamanho e peso do animal, bem como do estado de saúde geral deste (LUMEIJ, 1997). Para a maioria das espécies de aves, é considerado seguro realizar a coleta de sangue correspondente a aproximadamente 1% ou 2% do peso corporal (CAMPBELL; ELLIS, 2007).

Nas galinhas, apesar do baço não funcionar de maneira similar ao dos mamíferos, como reservatório de eritrócitos, é observado uma rápida recuperação após perdas de sangue (CLARK; RAIDAL, 2009b). Uma das explicações para este fato é que a vida média das hemácias das aves é mais curta que nos mamíferos, e o processo de eritropoese ou produção das hemácias na medula óssea vermelha é mais acelerado (MITCHELL; JOHNS, 2008).

Outra particularidade que deve ser considerada na coleta de sangue em aves é a inexistência do músculo diafragma, que é capaz de contrair e relaxar, aumentando e diminuindo a pressão interna da cavidade torácica e permitindo a respiração em mamíferos. As aves possuem os sacos aéreos, que servem como reservatório de oxigênio e permitem a chegada deste ao pequeno pulmão (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004). Por conta desta particularidade, a contenção para a punção sanguínea deve ser o mais breve possível e sem utilização excessiva de força, para não levar a ave a uma hipóxia e posterior asfixia (RITCHIE; HARRISON; HARRISON, 1994).

Dependendo do contexto da coleta, o uso de uma toalha para inibir os movimentos e retirar a visão do animal é preferível, pois esta prática diminui a quantidade de ferimentos e acalma a ave até determinado ponto (CAPITELLI; CROSTA, 2013). De acordo com Getty (1986), com o processo de domesticação as aves da espécie *Gallus gallus* perderam um dos sacos aéreos. Assim, as aves desta espécie são uma das poucas com apenas oito sacos aéreos, o que torna a coleta de sangue destas mais dificultada em relação às demais espécies.

De acordo com Círule et al. (2012), o aumento do cortisol resultante do estresse causado pela contenção ocasiona alteração dos parâmetros hematológicos, bem como pode dificultar o processo da extração do material genético. Assim, é recomendado que se faça o que for possível para diminuir o aumento do cortisol e garantir o bem-estar do animal durante a coleta de sangue. Swenson e Reece (1996) ressaltam que a capacidade de contração muscular cardíaca das aves é maior em relação aos mamíferos, o que facilita a dissipação do cortisol circulante e, por consequência, torna mais perceptível sua ação. No caso de pequenas aves, como o beija-flor, a frequência cardíaca pode chegar a até 1000 batimentos por

minuto.

No caso de aves selvagens que nunca foram submetidas a manejo, a resposta de aumento do cortisol, fruto da contenção, pode ter consequências fatais, secundárias à miopatia por conta da captura (PONJOAN et al., 2008). Nestes casos, para minimizar o aumento do hormônio cortisol, é crucial um planejamento antes da coleta, para que esta ocorra em momentos mais frios do dia e seja realizada da forma mais rápida possível e com posterior fornecimento de suprimento de oxigênio para as aves respirarem (BUSINGA; LANGENBERG; CARLSON, 2007).

Outra possibilidade para minimizar as respostas ao estresse seria anestesiá-lo animal, porém este procedimento não deve ser rotina. O uso de anestésicos compromete em pequena escala toda a composição proteica e metabólica das aves, o que também pode interferir no tempo que a amostra de sangue pode ficar estocada sem perder qualidade (WARD et al., 2011).

Um dos principais locais de colheita sanguínea em aves é a veia jugular direita, que – é utilizada com frequência porque apresenta baixa predisposição a formar hematomas e tem calibre aumentado, o que também dificulta a coagulação no momento da coleta (Figura 1). Embora a veia jugular seja móvel e possa dificultar a punção, basta estabilizá-la com auxílio de uma das mãos (CAPITELLI; CROSTA, 2013).



Figura 1. Veia jugular direita - Fonte: <http://fauna.vet.br/site/wp-content/uploads/2017/08/EBOOK-Conten%C3%A7%C3%A3o-e-colheita-de-sangue-1.pdf>

A veia ulnar (ou da asa) também é um dos locais mais utilizados atualmente para a coleta de sangue em aves de produção comercial (Figura 2). Esta veia oferece a possibilidade de fácil observação da veia, porque a área de sua localização tem poucas penas ao redor. Deve-se ter cuidado na manipulação do animal, porque facilmente se tem a formação de hematomas ao realizar a coleta na veia ulnar (CLARK; BOARDMAN; RAIDAL, 2009a).



Figura 2. Coleta sangue pela Veia ulnar (ou da asa) - Fonte: Arquivo pessoal

Outra opção importante para a coleta de sangue é a veia metatarsiana medial, que pode ser acessada em aves que tenham problemas para possibilitar o acesso à veia jugular, como é o caso de pombos e, em geral, as aves que tenham comida no papo, pois não afetará a ingestão do alimento (Figura 3) (BOETTCHER, 2004).



Figura 3. Veia matatarsiana medial - Fonte: adaptado de Konig eLiebich (2012)

Especialmente em indivíduos de pequeno porte, os hematomas devem ser evitados, pois ocasionam perda extra de sangue, podendo levar ao comprometimento da volemia do animal. Como descrito anteriormente, as aves dispõem de um pequeno volume sanguíneo. Além disso, hematomas levam à cascata de inflamação, que até estar sanada pelo corpo, diminuirá o desempenho produtivo do animal (CAMPBELL, 1994).

Não é necessário fazer garrote nas aves, pois este predispõe à formação de hematomas, assim, para melhor visualização da veia, é preferível usar álcool. As aves são mais susceptíveis à formação de hematomas por terem pouco tecido conjuntivo. Com isso, a drenagem dos produtos da cascata de coagulação,

resultante do trauma, fica sempre deficitária. Recomenda-se assim, aplicar pressão no local da punção durante 30 segundos após a retirada da agulha, para facilitar o recrutamento dos fatores de coagulação e garantir que as plaquetas realmente cheguem ao local (CLARK; BOARDMAN; RAIDAL, 2009a).

Para manter a conservação do sangue coletado por mais tempo e, principalmente, com uma qualidade boa, deve-se sempre evitar o processo de hemólise, que seria a quebra da membrana celular da hemácia e, por consequência, lançamento da hemoglobina e outras substâncias no meio. Até mesmo o calibre da seringa deve ser considerado, de modo que, para aves, não se deve ultrapassar 25G. Além disso, deve-se se fazer a menor pressão possível no êmbolo da agulha, para não se ter hemólise ou pior, rompimento da veia. Após passar o sangue para o tubo com anticoagulante, deve-se homogeneizá-lo para que a totalidade deste entre em contato com a substância anticoagulante (CAPITELLI; CROSTA, 2013).

Com relação a qual anticoagulante usar, existem divergências sobre qual é o melhor. Muitos laboratórios preferem a heparina lítica, mesmo esta apresentando a desvantagem de formação de agregados celulares. Neste caso, a preferência pode ser devido ao fato de que a heparina proporcionaria maior conservação do material genético, uma vez que as membranas celulares continuariam integras e possibilitando maior proteção do DNA contra intempéries externas (CAMPBELL, 1994; CAMPBELL, 2004; CÂNDIDO, 2008).

É importante ressaltar que, diferente dos mamíferos, as hemácias das aves possuem núcleo e, por consequência, DNA. Assim, a hemólise destes eritrócitos leva a uma degradação do material genético que estava conservado dentro do núcleo, citoplasma e membrana celular da hemácia, consecutivamente. Em estudos comparativos entre anticoagulantes, os pesquisadores comprovaram que o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) causa rompimento dos eritrócitos em muitas espécies de aves, causando hemólise progressiva, o que não é desejado (GONZÁLEZ; SILVA, 2006; SCHMIDT et al., 2007).

3 | EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DAS AVES

Esta etapa apresenta custo e complexidade um pouco maiores em comparação com a anterior, por exigir maiores estruturas de laboratório (centrífugas e banho maria) e de reagentes, que somam valores elevados, ao final de todo o processamento das amostras. Em geral, existem vários protocolos que permitem a obtenção de DNA de diferentes tipos de amostras, porém, observa-se grande variação na qualidade e durabilidade da amostra obtida (VIEIRA; COELHO; OLIVEIRA, 2010).

O DNA extraído deve permanecer íntegro ou viável durante a maior quantidade de meses possível, para que uma única extração possa ser aproveitada pelo laboratório, nas mais diversas atividades, desde amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*), até mesmo o uso de marcadores moleculares (MULLIS, 1990).

Quase a totalidade dos protocolos disponíveis para extração do DNA a partir de sangue busca maior rapidez do processo com menores custos, por exemplo: extração de DNA com fenol (ISOLA et al., 1994); extração com partículas de sílica (BOOM et al., 1990); extração com sílica associada à digestão enzimática (MESQUITA et al., 2001); extração com fenol e clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989); extração alcalina (RUDBECK et al., 1998); e os protocolos sugeridos por fabricantes de kits comerciais de extração. Estes últimos (kits comerciais) apresentam os maiores custos por amostra, mas têm maior praticidade na obtenção.

Em estudos comparando diversos protocolos de extração do DNA em aves, Júnior et al. (2015) constataram que protocolos com etapas de purificação do material genético apresentaram em média menor concentração de DNA, quando comparados com os protocolos que terminam na lavagem. Contudo, os graus de pureza das amostras com maiores concentrações eram bem menores, o que levaria a menor vida útil do DNA extraído, bem como a maior dificuldade para conseguir amplificar a região desejada a partir de reação em cadeia da polimerase.

A avaliação da qualidade (concentração) e pureza de DNA extraído pode ser feita por meio de corrida em gel de agarose na cuba de eletroforese, onde serão visualizadas as bandas por meio de foto documentação. Neste caso, é possível observar a concentração de DNA pela intensidade de fluorescência das bandas, como pode ser observado na Figura 4 (COELHO et al., 2004).

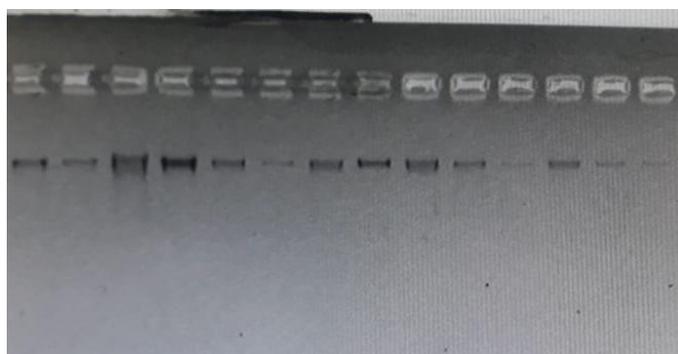


Figura 4. Diferentes intensidades de fluorescência em 14 amostras de DNA extraído da espécie *Gallus gallus*. Fonte: arquivo próprio

Outra maneira para realizar a quantificação de DNA é por meio de espectrofotometria, que converte a capacidade de absorvância da amostra extraída em concentração. Com uso do aparelho espectrofotômetro, é possível observar o

grau de pureza da amostra, ou seja, o quanto desta não é DNA puro, diferindo essa “não pureza” em duas partes: proteína contaminante; e sais/reagentes (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC, 2010).

Após avaliados a qualidade (concentração) e o grau de pureza do DNA, em adição ao custo para se obter uma amostra extraída, ainda é necessário saber por quanto tempo e para qual finalidade esse material será utilizado. Somente depois de avaliar cada variável, o laboratório será capaz de optar ou não por algum protocolo, de modo que não existe um método melhor para se indicar, mas sim o mais aplicável às suas atividades, materiais e realidade (MESQUITA et al., 2001).

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para as aves, a forma de coleta é de extrema importância, independente do direcionamento que a amostra terá. Portanto, deve-se procurar diminuir o estresse gerado no animal para não comprometer a qualidade do sangue e para prolongar a sua vida útil.

Para estudos de biologia molecular, os tubos com heparina lítica demonstram-se mais adequados às peculiaridades das aves, evitando a hemólise das células vermelhas e, por consequência, perda do material genético.

A extração de DNA é uma etapa um pouco mais onerosa no geral, porque precisa de uma estrutura mínima laboratorial e de reagentes mais específicos. A escolha de qual protocolo de extração adotar é diretamente relacionada às condições financeiras disponíveis, objetivo posterior à extração e tempo desejado para a estocagem do material.

REFERÊNCIAS

ABREU, R. D.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; COSTA, M. C. M. M. **Frangos e ovos caipiras: Produção de frangos e ovos**. Brasília/DF, SENAR, 115p. 2004.

BOELLING, D. et al. **Genetic improvement of livestock for organic farming systems**. *Livestock Production Science*, v. 80, p. 79-88, 2003.

BOETTCHER, A. **Valores bioquímicos sanguíneos del cisne de cuello negro (*Cygnus melanocoryphus*, Molina 1782), en una población silvestre, de Valdivia, Chile**. Valdivia, Chile: UACH, 2004. 66p. Memória de Título (Médico Veterinário). Universidad Austral de Chile, 2004.

BOOM, R. et al. **Rapid and simple method for purification of nucleic acids**. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BUSINGA, N. K.; LANGENBERG, J.; CARLSON, L. V. **Successful treatment of capture myopathy in three wild Greater sandhill cranes (*Grus Canadensis tabida*)**. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v. 21, n. 4, p. 294-298, 2007.

CAMPBELL, T. W. **Blood biochemistry of lower vertebrates**. In: Annual Meeting of the American

College of Veterinary Pathologists (ACVP), 55, e Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP), 39, 2004, Middleton. Proceedings... 2004.

CAMPBELL, T. W. **Hematology**. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON L. R (Org.). Avian medicine: principles and application. 1. ed. Lake Worth: Wingers Publishing, p. 176-198. 1994.

CAMPBELL, T. W.; ELLIS, C. K. **Avian and exotic animal hematology and cytology**. 3. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 304p. 2007.

CÂNDIDO, M. V. **Hematologia, bioquímica sérica e nutrição em aves: cracidae**. Curitiba, PR: UFPR, 2008. 38p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, 2008.

CAPITELLI, R.; CROSTA, L. **Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species**. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice, v. 16, p. 71-120, 2013.

ČĪRULE, D. et al. **A rapid effect of handling on counts of white blood cells in a wintering passerine bird: a more practical measure of stress?** Journal of Ornithology, v. 153, p. 161-166, 2012.

CLARK, P.; BOARDMAN, W.; RAIDAL, S. **Atlas of clinical avian hematology**. Oxford: Blackwell Publishing, 184p. 2009a.

CLARK, P.; RAIDAL, S. R. **Haematological indicators of inflammation exhibited by Australian falconiformes**. Comparative Clinical Pathology, v. 18, p. 1-6, 2009b.

COELHO, E. G. A. et al. **Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração**. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 56, p. 111-115, 2004.

DEKKERS, J. C. M.; HOSPITAL, F. **The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations**. Nature Reviews Genetics, v. 3, p. 22-32, 2002.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. In: **Aplicações de PCR em Ecologia Molecular**. In.: Melo, I. S.; Azevedo, J. L., (Ed). Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA. Cap. 8, p. 205-227.1998.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000p. 1986.

GONZÁLEZ, F.; SILVA, S. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 37p. 2006.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios integrados de Zoologia**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 158p. 2004.

ISOLA, J. et al. **Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples**. American Journal Pathology, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, 1994.

JÚNIOR, A.B. et al. **Análise comparativa de protocolos para extração de DNA de galinhas caipiras em relação à eficiência, facilidade da extração e custo**. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 9, n. 11, p. 483-489, 2015.

KONIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomy of Domestic Animals**. 2. ed. Madrid: Editorial Medica Panamericana Saúde, 720p. 2012.

- LUMEIJ, J. T. **Avian Clinical Biochemistry**. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5. ed. San Diego: Academic Press, 932p.1997.
- MESQUITA, R. A. et al. **Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR**. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, v. 15, n. 4, p. 314-319, 2001.
- MITCHELL, E. B.; JOHNS, J. **Avian hematology and related disorders**. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, v. 11, v. 3, p. 501-522, 2008.
- MOKHTARZADEH, S. et al. **Investigation of Leptin's Receptor Gene Polymorphism, by Using PCR-RFLP Technique in Native Poultry Population of Khouzestan Province**. *Research Journal of Biological Sciences*, v. 4, n. 8, p. 933-936, 2009.
- MULLIS, K. B. **The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction**. *Scientific American*, v. 262, n. 4, p. 56-65, 1990.
- PONJOAN, A. et al. **Adverse effects of capture and handling little bustard**. *The Journal of Wildlife Management*, v. 72, n. 1, p. 315-319, 2008.
- RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian medicine: principles and applications**. Lake Worth: Wingers Publishing, Inc., 1384p. 1994.
- RUDBECK, L.; DISSING, J. **Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR**. *Biotechniques*, v. 25, n. 4, p. 598-592, 1998.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SANTANA FILHO, E. P.; LIMA, D. J. **Criação de aves semiconfinadas**. Ilhéus: Ceplac/ Cenex, 48p. 2012.
- SAVINO, V. J. M. et al. **Avaliação de materiais genéticos visando à produção de frango caipira em diferentes sistemas de alimentação**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, p. 578-583, 2007.
- SCHMIDT, E. M. S. et al. **Patologia clínica em aves de produção – Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – revisão**. *Archives of Veterinary Science*, v. 12, n. 3, p. 9-20, 2007.
- SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 856p. 1996.
- TAKAHASHI, S. E. **Efeito do sistema de criação sobre o desempenho e a qualidade de carne de frangos de corte tipo colonial e industrial**. Botucatu: SP: UNESP, 2003. 64p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Universidade Estadual Paulista, 2003.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. **Thermo Scientific Nano Drop Spectrophotometers**. Thermo Fisher Scientific, 30p. 2010.
- VIEIRA, J. N.; COELHO, E. G. A.; OLIVEIRA, D. A. A. **Comparação de três técnicas de extração de DNA para sexagem molecular em aves**. *Veterinária e Zootecnia*, v. 17, p. 394-398, 2010.
- WARD, J. M. et al. **Midazolam as an adjunctive therapy for capture myopathy in bar-tailed godwits (*Limosa lapponica baueri*) with prognostic indicators**. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 47, n. 4, p. 925-935, 2011.