



## Sexagem em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) por meio do teste da reação em cadeia da polimerase

[*Polymerase chain reaction for sexing in giant anteater's (Myrmecophaga tridactyla)*]

H.J. Bento<sup>1</sup>, J.M.A. Rosa<sup>1</sup>, T.O. Morgado<sup>2</sup>, M.D.B. Granjeiro<sup>2</sup>, M.A. Bianchini<sup>2</sup>,  
G.A. Iglesias<sup>1</sup>, V. Dutra<sup>1</sup>, L. Nakazato<sup>1</sup>, R.C.R. Paz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de pós-graduação – FAVET, UFMT – Cuiabá, MT

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – FAVET-UFMT – Cuiabá, MT

H.J. Bento1  
<https://orcid.org/0000-0002-8670-1515>  
J.M.A. Rosa1  
<https://orcid.org/0000-0001-5397-6064>  
T.O. Morgado2  
<https://orcid.org/0000-0002-2974-3241>  
M.D.B. Granjeiro2  
<https://orcid.org/0000-0001-6298-6635>  
M.A. Bianchini2  
<https://orcid.org/0000-0001-7749-625X>  
G.A. Iglesias1  
<https://orcid.org/0000-0001-6578-0456>  
V. Dutra1  
<https://orcid.org/0000-0002-6630-2293>  
L. Nakazato1  
<https://orcid.org/0000-0002-1244-0690>  
R.C.R. Paz1  
<https://orcid.org/0000-0003-45670043>

### RESUMO

Em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) não há dimorfismo sexual, tornando-se necessária a diferenciação entre machos e fêmeas, em especial naqueles indivíduos com finalidade reprodutiva. Entre as diversas técnicas empregadas para a caracterização sexual, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é utilizada em mamíferos para identificar uma sequência genética específica do cromossomo Y (SRY), sendo considerado um meio moderno e eficaz de determinação sexual. O objetivo deste trabalho é padronizar um protocolo para determinação sexual de tamanduá-bandeira por meio da técnica de PCR, utilizando material genético extraído do bulbo capilar desses animais. Mediante esse protocolo, foi possível determinar o sexo de sete animais testados, sendo compatível com o sexo de cada indivíduo. Conclui-se que o protocolo padronizado apresentou total eficácia, sendo possível determinar o sexo de tamanduás-bandeira utilizando material genético extraído do bulbo capilar.

Palavras-chave: pilosa, reprodução, conservação, determinação sexual, DNA

### ABSTRACT

*There is no sexual dimorphism in the giant anteater (Myrmecophaga tridactyla), so the distinction between males and females become necessary, especially in animals with reproductive purpose. The Polymerase Chain Reaction (PCR), among the various techniques used for characterization, is considered a modern and effective means of sex determination and used in mammals to identify the Y chromosome (SRY) specifies genetic sequence. The objective of this work is to standardize a protocol for sex determination of giant anteater by PCR technique, using genetic material extracted from the capillary bulb of these animals. With this protocol was possible the sex determination of seven tested animals, being compatible with the sex of each individual. In conclusion, this protocol showed total effectiveness, being possible to determine the giant anteater sex using genetic material extracted from the capillary bulb.*

Keywords: pilosa, reproduction, conservation, sexing determination, DNA

### INTRODUÇÃO

Em mamíferos, a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase), usada para identificar uma sequência genética específica do cromossomo Y (SRY), é tida como um método eficaz na determinação sexual de diversas espécies (Luz *et al.*, 2000; Takami *et al.*, 1998). Sangue, pele,

pelos (devendo este ser preferencialmente coletado com a raiz), entre outros tecidos e estruturas, fornecem material genético para a determinação sexual de animais (Wischrall e Gomes Filho, 2009).

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) é um mamífero de grande porte, encontrado desde a Guatemala, na América Central, até o sul da América do Sul, sendo

Recebido em 12 de abril de 2017

Aceito em 31 de agosto de 2018

E-mail: heitorjbento@gmail.com

encontrado em todo o território brasileiro (Silveira *et al.*, 1999; Miranda, 2004). Diversas causas, como a redução do seu *habitat* natural, queimadas, caça e morte por atropelamentos, ameaçam essa espécie (Medri e Mourão, 2008).

Em tamanduás-bandeira machos, os testículos estão localizados na cavidade pélvica e o pênis é pequeno, com pouca quantidade de tecido erétil e ausência de glândula. Em tamanduás-bandeira fêmeas, a abertura vaginal central apresenta um diâmetro de 1,5 centímetro, útero simples e prega mucosa que separa o vestíbulo vulvar da vagina (Schauerte e Osmann, 2012; Rossi *et al.*, 2013).

Nessa espécie, não há dimorfismo sexual, tornando necessário que se faça a diferenciação entre machos e fêmeas, especialmente naqueles indivíduos com finalidade reprodutiva mantidos em cativeiro ou até mesmo para controle em populações de vida livre, como forma de prevenção de efeitos deletérios já conhecidos que ameacem a conservação da espécie (Collevatti *et al.*, 2007; Luna *et al.*, 2014).

Em tamanduás-bandeira, o ciclo estral dura, em média, 51 dias, com gestação entre 183 e 190 dias, sendo concebido um único filhote (Patzl *et al.*, 1998; Luna *et al.*, 2014). Em indivíduos mantidos cativos, não há um consenso acerca da estacionalidade reprodutiva, sendo relatada essa condição em espécimes na Alemanha (Patzl *et al.*, 1998) e na Colômbia (Romero *et al.*, 2010). Outros aspectos da biologia dessa espécie devem ser considerados na formação de grupos mantidos em cativeiro, visto que o tamanduá-bandeira é um animal territorialista e solitário na maior parte do tempo, com exceção do encontro entre machos e fêmeas nos períodos de acasalamento, o que torna propenso o caso de brigas, principalmente entre machos (Miranda, 2014; Coelho, 2001).

A determinação sexual em tamanduás-bandeira pode ser realizada por meio da coleta de sangue para análise cromossômica ou da palpação da genitália externa, mas essas técnicas são pouco indicadas devido a riscos para o animal, como a necessidade de ser realizada contenção química, até a dificuldade de uma contenção física. A coleta de pelo juntamente com o bulbo por

retirada mecânica é um método simples e, mediante este, é possível extrair material genético e, por meio da técnica molecular de PCR, amplificar uma sequência do gene SRY específico para macho (Luna *et al.*, 2014).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é padronizar um protocolo para determinação sexual de tamanduá-bandeira pela técnica de PCR, utilizando material genético extraído do bulbo capilar desses animais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os pelos utilizados neste experimento foram coletados juntamente com o bulbo em seis animais mantidos em cativeiro no Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso (Zoo-UFMT) e de um animal recebido para atendimento no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (Hovet-UFMT). O presente experimento teve autorização para atividades com finalidade didática no âmbito do ensino superior emitida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, documento nº 23774-1.

Os animais mantidos em cativeiro no Zoológico da UFMT foram nomeados de T1, T2, T3, T4, T5 e T6, sendo o sexo conhecido (três machos e três fêmeas) por participarem de projetos de avaliação reprodutiva realizados anteriormente (Tsuneda *et al.*, 2015; Lopes *et al.*, 2015). O animal atendido no Hovet-UFMT tinha o sexo conhecido (macho) mediante avaliação externa da genitália e foi nomeado de T7. Os pelos foram coletados por meio do arranque manual (Fig. 1) utilizando-se luvas, trocadas a cada procedimento para evitar a contaminação do material, acondicionados em tubos Falcon estéril, congelados a -4°C e enviados ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Mato Grosso.

Para realização da extração de DNA, as hastas de 10 pelos de cada animal foram cortadas e, a partir do bulbo, foi feita a extração de DNA das amostras com base na técnica de fenol-clorofórmio descrita por Sambrook e Russell (2001).



Figura 1. Coleta de pelos de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) juntamente com o bulbo por meio de arranque manual para realização de extração de material genético. No detalhe, é possível observar os pelos acondicionados em tubo Falcon estéril.

O *primer* utilizado neste estudo foi obtido de acordo com a sequência da região pY53.3 do DNA humano (Sinclair *et al.*, 1990) com os nucleotídeos da posição 591-621 (5'-AAGCGACCCATGAATGCATTCATGGTGTG GT-3') e 768-804 (5'-GAGGTCGATACTTATAGTTCGGGTATTTCTCTGTG-3') (Kageyama *et al.*, 1992). Para a amplificação, foi utilizada uma reação com volume final de 25 $\mu$ L, contendo 4 $\mu$ L do DNA testado, 0,7 $\mu$ L de *primer* (20pmol), 5 $\mu$ L de

DNTPs (1mM), 2,5 $\mu$ L de tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH 8,4, 500mMKCl), 0,5 $\mu$ L de Taq DNA polimerase, 1 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> e 11,3 $\mu$ L de água ultrapura. No controle negativo, os 4 $\mu$ L de DNA foram substituídos por 4 $\mu$ L de água ultrapura, a fim de completar o volume final da reação; este *master mix* foi todo preparado em capela estéril. Como controle positivo, foram utilizados 4 $\mu$ L de DNA do animal T4, por ser um macho com histórico de reprodução quando mantido com uma fêmea em cativeiro na instituição zoológica.

A reação foi realizada em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos; 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, anelamento dos oligonucleotídeos a 56°C por 30 segundos, extensão por 30 segundos a 72°C; e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. O produto de amplificação, corado com GelRedTm (NucleicAcid gel stain, Biotium), foi fracionado por eletroforese em gel de agarose (2,0%) e analisado em sistema de fotodocumentação ChemiDocTm XRS+(Bio-Rad).

## RESULTADOS

Por meio do protocolo utilizado neste experimento, foi possível determinar o sexo dos animais testados, e os resultados confirmaram o sexo já conhecido de cada indivíduo. Nos animais T1, T2, T4 e T7, visualizou-se amplificação de um fragmento de 212pb, confirmando que esses indivíduos são machos. Nos demais animais, T3, T5 e T6, não se observou amplificação, confirmando que esses indivíduos são fêmeas (Fig. 2).

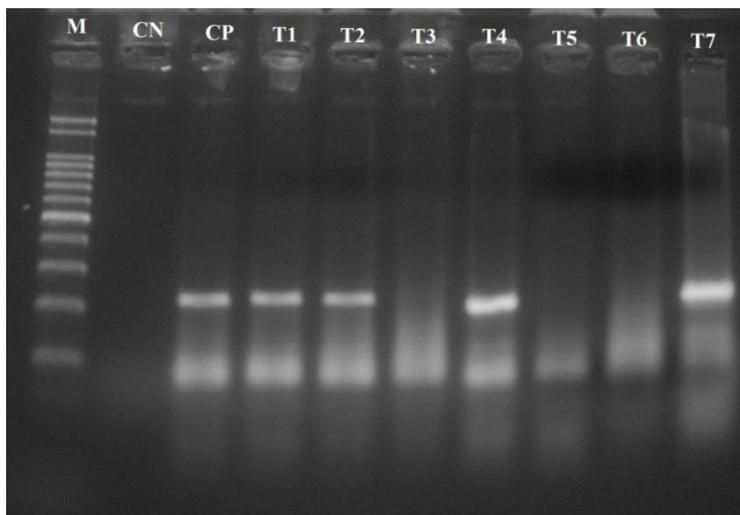


Figura 2. Gel de agarose 2% com amplificação de 212pb em DNA de tamanduás-bandeira submetidos à sexagem por meio de técnica de PCR. (M: marcador Ladder 100pb; CN: controle negativo; CP: controle positivo; T1: tamanduá 1; T2: tamanduá 2; T3: tamanduá 3; T4: tamanduá 4; T5: tamanduá 5; T6: tamanduá 6; T7: tamanduá 7).

## DISCUSSÃO

Conforme observado, o protocolo utilizado mostrou-se eficaz na determinação sexual dos indivíduos testados, sendo sensível, de rápida identificação e confiável. A amplificação de um produto de 212pb ocorreu apenas nos indivíduos conhecidamente machos, como o animal T4, ao contrário das fêmeas em que não houve amplificação, como o animal T3, mantido na instituição zoológica e com histórico de crias. Assim como nos resultados obtidos neste experimento, em estudo realizado por Takami *et al.* (1998) para a determinação sexual de tamanduás-bandeira, houve a amplificação de um produto de 212pb apenas em animais machos, pois utiliza-se um *primer* formado por uma sequência de oligonucleotídeos presente no gene SRY, enquanto nas fêmeas não se observa a amplificação por elas não conterem esse gene. O gene SRY é específico do cromossomo Y, localizando-se em uma pequena região do braço curto distal deste, e possui um papel importante no determinismo dos testículos, o que justifica a amplificação de um produto na PCR apenas nos indivíduos machos (Damiani *et al.*, 2000).

Ainda que a coleta de sangue para análise cromossômica e a análise da genitália externa por meio de palpação sejam métodos eficientes para determinação sexual de tamanduás-bandeira, a realização desses procedimentos

requer contenção física e/ou química, gerando estresse ao animal. Em muitos casos, a contenção química desses animais é realizada com base em um peso estimado, possibilitando uma sub ou sobredosagem do fármaco, podendo levar, por exemplo, à overdose anestésica e à morte (Brainard *et al.*, 2008). As particularidades anatômicas dessa espécie, como o focinho longo e a boca pequena, impossibilitam procedimentos de emergência comuns a outras espécies; em quadros de apneia durante anestesia em tamanduás-bandeira, o tamanho limitado da cavidade oral dificulta a realização de intubação orotraqueal, sendo necessário que se realize traqueostomia (Brainard *et al.*, 2008; Carregaro *et al.*, 2009), o que representa um risco maior ao animal.

A simples coleta de pelos, devendo esses conter o bulbo, possibilita que se extraia o DNA desses animais para determinação sexual por meio da PCR. Estudos realizados com humanos indicam que a concentração de DNA é maior no bulbo capilar, sendo este o ideal a ser utilizado na extração de material genético, visto que, ainda que o processo de queratinização dos fios não degrade o DNA, a concentração de material genético na haste é bem menor (Heywood *et al.*, 2003). Parte dos pelos utilizados neste estudo permaneceram congelados a -4°C por um período de cinco anos, mostrando que esse material pode ser mantido por um tempo considerável nessas

condições e, por meio dele, pode-se obter material genético que possibilite a realização da sexagem pela técnica de PCR.

Para a realização de sexagem em animais, a escolha da técnica de extração do DNA, bem como o tempo de conservação desse material em laboratório, é de grande valia, visto que este pode ser usado no controle para a determinação sexual de outras espécies e para a realização de contraprovas, quando preciso (Vieira *et al.*, 2010). No presente estudo, a técnica de fenol-clorofórmio mostrou-se efetiva na extração do DNA no bulbo capilar, sendo possível utilizar esse material na determinação sexual dos tamanduás-bandeira, além de possibilitar o armazenamento deste em um banco de dados do laboratório. Em estudos feitos comparando diferentes protocolos de extração de DNA em pena e sangue para a determinação sexual de aves, a técnica de fenol-clorofórmio mostrou-se eficiente, podendo esse material genético extraído ser armazenado por até oito meses a 4°C e por até nove meses a -20°C (Coelho, 2001; Sambrook *et al.*, 1989; Vieira *et al.*, 2010).

O uso de tecnologias reprodutivas aplicadas a animais silvestres, como coleta e criopreservação de sêmen, inseminação artificial e clonagem, por exemplo, associadas a estudos endócrinos e de variabilidade genética, é cada vez mais crescente (Luna *et al.*, 2014). Em tamanduás-bandeira, estudos acerca do comportamento e da ecologia, bem como o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico gestacional e do ciclo estral pouco invasivas, são importantes a fim de se otimizarem as técnicas de reprodução e a taxa de natalidade em indivíduos *in situ* e *ex situ* (Rezende *et al.*, 2013). Dessa forma, a extração de material genético aqui realizada, além de pouco invasiva, contribui para a eficiência de técnicas reprodutivas e consequente conservação dessa espécie, seja utilizando esse material genético para a realização de sexagem ou para outras técnicas de biologia molecular voltadas à reprodução e conservação.

A reação utilizada bem como o protocolo usado no termociclador foram feitos com base em trabalho de Takami *et al.* (1998), com adequações. Esses autores utilizaram uma reação com volume total de 50µL, composta por 2µL de DNA, 2µL de *upstream primer*, 2µL de *downstream primer*, 5µL de DNTP, 5µL de

tampão PCR 10x, 1µL de Taq DNA polimerase e 33µL de água destilada. O protocolo utilizado no termociclador foi composto por 32 ciclos: desnaturação inicial a 93°C por um minuto; anelamento dos oligonucleotídeos a 55°C por dois minutos; extensão por três minutos a 72°C; e uma extensão final de sete minutos a 72°C. O produto de amplificação foi fracionado por eletroforese em gel de agarose (2,5%) e analisado em sistema de fotodocumentação não informado pelos autores. Segundo eles, dos 10 animais com sexo desconhecido testados nesse experimento, foi possível confirmar o sexo por meio desse protocolo em apenas dois indivíduos, que vieram a óbito e foram submetidos à necropsia, não sendo possível confirmar se o resultado da PCR era semelhante ao sexo real nos demais animais.

As adequações feitas nesse protocolo mostraram-se efetivas, possibilitando determinar, com base nele, o sexo de todos os animais testados e sendo o resultado compatível com o sexo previamente conhecido de cada indivíduo.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que o protocolo utilizado no presente estudo mostrou-se efetivo, sendo possível determinar o sexo de tamanduás-bandeira. Dessa forma, esse protocolo mostra-se como uma eficiente ferramenta na conservação dessa espécie, como meio de determinação sexual de indivíduos com finalidade reprodutiva, possibilitando a formação de casais em populações cativas e o estudo da correlação macho-fêmea em vida livre. Além disso, nos animais mantidos em cativeiro que não possuem finalidade reprodutiva, a determinação sexual pode auxiliar na formação de grupos, com o objetivo de evitar conflitos, principalmente no caso de machos que tendem a brigas devido ao aspecto territorialista e solitário dessa espécie.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à equipe do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da UFMT, pela concessão do espaço para realização dessa pesquisa, bem como à equipe do Zoológico da UFMT e do Setor de Medicina de Animais Silvestres do Hovet-UFMT, pelo fornecimento do material para realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

- BRAINARD, B.M.; NEWTON, A.; HINSHAW, K.C.; KLIDE, A. M. Tracheostomy in the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). *J. Zoo Wildlife Med.*, v.39, p.655-658, 2008.
- CARREGARO, A.B.; GERARDI, P.M.; HONSHO, D.K. Allometric scaling of chemical restraint associated with inhalant anesthesia in giant anteaters. *J. Wildlife Dis.*, v.45, p.547-551, 2009.
- COELHO, E.G.A. *Análise quali-quantitativa de técnicas para extração de DNA de sangue sêmen e pêlos*. 2001. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- COLLEVATTI, R.G.; LEITE, K.C.E.; MIRANDA, G.H.B.; RODRIGUES, F.H.G. Evidence of high inbreeding in a population of the endangered giant anteater *Myrmecophaga tridactyla* (*Myrmecophagidae*) from Emas National Park. *Genet. Mol. Biol.*, v.30, p.112-20, 2007.
- DAMIANI, D.; DICHTCHEKENIAN, V.; SETIANO, N. O enigma da determinação gonadal – O que existe além do cromossomo Y? *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v.44, p.248-56, 2000.
- HEYWOOD, D.M.; SKINNER, R.; CORNWELL, P.A. Analysis of DNA in hair fibers. *Int. J. Cosmetic Sci.*, v.54, p.21-27, 2003.
- KAGEYAMA, S.; MORIYASU, S.; TABATA, T.; CHIKUNI, K. Amplification and sequence analysis of SRY (sex-determining region Y) conserved region of domestic animals using polymerase chain reaction. *Anim. Sci. Technol.*, v.63, p.1059-1065, 1992.
- LOPES, E.R.; MORGADO, T.O.; MEIRELES, Y.S. *et al.* Ultrassonografia abdominal de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) mantidos em cativeiro. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.35, p.919-924, 2015.
- LUNA, H.S.; HOSSOTANI, C.M.S.; MOREIRA, F.M.A. Esforços para a conservação da espécie *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758: tecnologias aplicadas à reprodução. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.38, p.10-14, 2014.
- LUZ, M.R.; WATANABE, Y.R.; FERRO, J.A. *et al.* Sexagem de embriões bovinos fecundados in vitro pela técnica de PCR multiplex. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.37, p.453-456, 2000.
- MEDRI, I.M.; MOURÃO, G.M. *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758. In: MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A. P. (Eds.). *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente e Fundação Biodiversitas, 2008. p.711-713.
- MIRANDA, F. Cingulata (Tatus) e Pilosa (Preguiça e Tamanduás). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. (Eds.). *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. cap.33, p.707-722.
- MIRANDA, G.H.B. *Ecologia e conservação do tamanduá-bandeira (Myrmecophaga tridactyla Linnaeus, 1758) no Parque Estadual das Emas*. 2004. 81f. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- PATZL, M.; SCHWARZENBERGER, F.; OSMANN, C. *et al.* Monitoring ovarian cycle and pregnancy in the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) by faecal progesterone and oestrogen analysis. *Anim. Reprod. Sci.*, v.53, p.209-219, 1998.
- REZENDE, L.C.; GALDOS-RIVEROS, A.C.; MIGLINO, M.A.; FERREIRA, J.R. Aspectos da biologia reprodutiva em preguiças e tamanduá: uma revisão. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.37, p.354-359, 2013)
- ROMERO, J.A.A.; MARTÍNEZ, P.C.C.; HOLGUÍN, S.A.O.; PACHECO, R.M. Notas sobre el comportamiento de cortejo y apareamiento de *Myrmecophaga tridactyla* bajo condiciones ex situ. *Edentata*, v.11, p.34-43, 2010.
- ROSSI, L.F.; LUACES, J.P.; ALDANA MARCOS, H.J. *et al.* Anatomy and histology of the male reproductive tract and spermatogenesis fine structure in the Lesser Anteater (*Tamandua tetradactyla*, *Myrmecophagidae*, *Xenarthra*): morphological evidences of reproductive functions. *Anat. Histol. Embryol.*, v.42, p.1-10, 2013.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: CSHL Press, 1989. [545p.].

- SAMBROOK, J.; RUSSELL D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. [545p.].
- SHAUERTE, N.; OSMANN, C. Reprodução de tamanduás em cativeiro. In: MIRANDA, F. (Ed.). *Manutenção de tamanduás em cativeiro*. São Carlos: Cubo, 2012. p.134-145.
- SILVEIRA, L.; RODRIGUES, F.H.G.; JÁCOMO, A.T.A.; DINIZ FILHO, J.A.F. Impact of wildfires on the megafauna of Emas National Park, central Brazil. *Oryx*, v.33, p.108-114, 1999.
- SINCLAIR, A.H.; BERTA, P.; PALMER, M.S. et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, v.346, p.240-244, 1990.
- TAKAMI K.; YOSHIDA, M.; YOSHIDA, Y.; KOJIMA, Y. Sex determination in giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) using hair roots by polymerase chain reaction amplification. *J. Reprod. Develop.*, v.44, p.73-78, 1998.
- TSUNEDA, P.P.; DUARTE JUNIOR, M.F.; SENRA, L.E. et al. Análise seminal e padronização da coloração eosina-nigrosina em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v.22, p.198-201, 2015.
- VIEIRA, J.N.; COELHO, E.G.A.; OLIVEIRA, D.A.A. Comparação de três técnicas de extração de DNA para sexagem molecular em aves. *Vet. Zootec.*, v.17, p.394-98, 2010.
- WISCHRAL, A.; GOMES FILHO, M.A. Aplicações da biologia molecular na reprodução animal. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.1, p.59-63, 2009.