

**Inseminação artificial em codornas através de diferentes métodos de coleta de sêmen**  
**Artificial insemination in quails through different methods of semen collection**  
**Inseminación artificial en codornices usando diferentes métodos de recolección de semen**

Recebido: 04/03/2020 | Revisado: 07/03/2020 | Aceito: 13/03/2020 | Publicado: 20/03/2020

**Felipe Cardoso Serpa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5827-5352>

Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil

E-mail: [felipe.c.serpa@gmail.com](mailto:felipe.c.serpa@gmail.com)

**Ianglio Márcio Travassos Duarte Jácome**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6985-6585>

Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

E-mail: [ianglio@uol.com.br](mailto:ianglio@uol.com.br)

**Rodrigo Garófallo Garcia**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4978-9386>

Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil

E-mail: [rodrigogarcia@ufgd.edu.br](mailto:rodrigogarcia@ufgd.edu.br)

**Leonardo Faccenda Zanchin**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2536-245X>

Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

E-mail: [leonardofzanchin@hotmail.com](mailto:leonardofzanchin@hotmail.com)

**Ezequiel Somavilla Manfio**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2632-6087>

Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

E-mail: [ezequielmanfio@gmail.com](mailto:ezequielmanfio@gmail.com)

**Mabel Molinari**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1047-2792>

Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

E-mail: [mabelmolinari@yahoo.com.br](mailto:mabelmolinari@yahoo.com.br)

**Jean Kaique Valentim**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8547-4149>

Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil

E-mail: [kaique.tim@hotmail.com](mailto:kaique.tim@hotmail.com)

**Maria Fernanda de Castro Burbarelli**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8079-2890>

Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil

E-mail: [fariakita@gmail.com](mailto:fariakita@gmail.com)

**Bruna Barreto Przybulinski**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3478-3387>

Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil

E-mail: [bruna-b@hotmail.com](mailto:bruna-b@hotmail.com)

## Resumo

Objetivou-se avaliar diferentes métodos de coleta de sêmen em codornas e a possível viabilidade da inseminação artificial. Foram utilizados dois métodos de coleta: método 1: Massagem abdominal no macho, e método 2: Massagem abdominal na fêmea após a cópula do macho. Foram utilizadas 16 fêmeas e 13 machos da espécie *Coturnix coturnix coturnix*, com idade de 10 semanas. No primeiro método, o macho selecionado foi estimulado com a técnica massagem abdominal, fazendo-o liberar uma secreção espumosa pelas glândulas para cloacais e seu aparelho reprodutivo, a qual era coletada em uma seringa descartável de insulina de 1 ml, sendo posteriormente aplicada imediatamente na região da vagina de cada dupla de fêmeas do método 1. Já no segundo método 2, foi realizada a cópula do macho selecionado nas fêmeas manequins, onde as mesmas receberam uma massagem abdominal para a retirada do ejaculado do macho. Os ovos de cada método foram marcados e incubados durante 18 dias. Houve um índice de fertilidade de 0% no método 1, e de 4.88% no método 2. Após o insucesso nas taxas de fertilidade e viabilidade, procuraram-se os testes para detecção dos espermatozoides no sistema reprodutivo do macho através de cortes histológicos. Chegou-se à conclusão previa os métodos de inseminação artificial não foram eficientes por não exercerem a pressão necessária para viabilizar o espermatozoide. Dessa forma, os métodos de coleta de sêmen e inseminação artificial aplicado obtiveram índices indesejáveis, logo não são métodos viáveis de manejo reprodutivo em codornas.

**Palavras-chave:** Acasalamento, Aparelho reprodutivo, Fertilidade, Massagem, Reprodução.

## Abstract

The objective of this study was to evaluate different methods of semen collection in quails and the possible viability of artificial insemination. Two collection methods were used:

method 1: Abdominal massage in the male, and method 2: Abdominal massage in the female after male copulation. Were used 16 females and 13 males of the species *Coturnix coturnix coturnix*, aged 10 weeks. In the first method, the selected male was stimulated with the abdominal massage technique to release a foamy secretion through the glands for cloacal and his reproductive apparatus, which was collected in a disposable 1 ml insulin syringe, immediately and disposed in the vagina region of each pair of females in method 1. In the second method 2, the copulation of the selected male was performed in the mannequin females which received an abdominal massage for the removal of the male ejaculate. The eggs of each method were marked and incubated for 18 days. There was a fertility index of 0% in method 1, and 4.88% in method 2. After failure in fertility and feasibility rates, tests for sperm detection were sought in the male reproductive system through histological cuts. The conclusion was that the methods of artificial insemination were not efficient because did not exert the necessary pressure to enable sperm. Thus, the methods of semen collection and artificial insemination applied obtained undesirable indices and are not viable for reproductive management in quails.

**Keywords:** Mating, Reproductive appliance, Fertility, Massage, Reproduction.

### **Resumen**

El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes métodos de recolección de semen en codornices y la posible viabilidad de la inseminación artificial. Se utilizaron dos métodos de colección: método 1: Masaje abdominal en el macho, y método 2: Masaje abdominal en la hembra después de la cópula masculina. Utilizamos 16 hembras y 13 machos de la especie *Coturnix coturnix coturnix*, con 10 semanas de edad. En el primer método, el macho seleccionado fue estimulado con la técnica de masaje abdominal, haciendo que liberara una secreción espumosa a través de las glándulas para los cloacales y su aparato reproductivo, que se recogió en una jeringa desechable de 1 ml de insulina, siendo posteriormente aplicado inmediatamente en la región vagina de cada par de hembras en el método 1. En el segundo método 2, la cópula del macho seleccionado se realizó en las hembras de maniquí, donde recibieron un masaje abdominal para la extracción de la eyaculación masculina. Los huevos de cada método fueron marcados e incubados durante 18 días. Hubo un índice de fertilidad del 0% en el método 1, y del 4,88% en el método 2. Después de fallas en las tasas de fertilidad y viabilidad, se buscaron pruebas para la detección de espermatozoides en el sistema reproductivo masculino a través de cortes histológicos. Se llegó a la conclusión preverque los métodos de inseminación artificial no eran eficientes porque no ejercían la presión necesaria

para permitir los espermatozoides. A partir de cortes histológicos fue posible identificar y localizar espermatozoides en todo el sistema reproductivo en el macho específicamente en el conducto deferente. Por lo tanto, los métodos de recolección de semen e inseminación artificial aplicados obtuvieron índices indeseables, por lo que no son métodos viables de gestión reproductiva en las codornices.

**Palabras clave:** apareamiento, órganos reproductivos, fertilidad, masaje, reproducción.

## 1. Introdução

A criação de codornas como fonte de carne e ovos, apresentou um crescimento acentuado no decorrer dos últimos anos. O que alavancou os estudos relacionados a métodos e tecnologias para uma melhor e maior produção, levando em consideração sempre reduzir custos e valorizar cada vez mais os produtos (Pastore et al. 2012). Ao longo dos últimos anos pode-se verificar em diversos trabalhos, a busca por melhores alternativas e tecnologias voltadas para o desenvolvimento da produção de codornas, com pesquisas voltadas principalmente para a genética, nutrição e manejo das codornas, entretanto pesquisas voltadas a parte de reprodução destes animais ainda são escassas.

Mas a importância de estudos relacionados à coturnicultura não apresenta como base somente o interesse na codorna como animal modelo experimental, mas, também, como fonte alternativa e sustentável de alimento humano (Bittencourt et al. 2019). De acordo com Araújo Góes et al. (2011) apesar do intenso investimento da comunidade científica em pesquisas de criopreservação de sêmen, na produção avícola, esses métodos têm sido pouco utilizados, e uma das razões é o fato de a inseminação artificial não ser amplamente usada em muitas espécies de aves domésticas.

Embora a inseminação artificial com sêmen fresco seja usada amplamente em algumas espécies ou cruzamentos, esse método é pouco empregado em galos, marrecos, gansos, codornas, avestruzes e emas (Getachew, 2016). A coturnicultura não possui referências científicas, que demonstrem as formas adequadas de coleta do sêmen dos machos da espécie.

A aplicação da técnica de Inseminação Artificial (IA) tem enorme potencial se aplicada para aves em geral, devido ao controle sobre a reprodução e à sua relativa simplicidade. No entanto, a aplicação comercial tem uma restrição a alguns núcleos de reprodução da avicultura industrial (Bongalardo, 2013).

Se as condições apresentarem ótimas instalações e manejo, espera-se da técnica de IA uma melhoria nos índices de fertilidade. Porém, a utilização ou não da técnica está sujeita a

uma análise econômica, feita pelo balanço entre suas vantagens e desvantagens em relação ao acasalamento natural (Carvalho et al. 2019).

Tendo em vista a inexistência na literatura científica a respeito de coleta de sêmen dos machos de codorna de corte, o trabalho teve por objetivo verificar a eficiência de dois métodos de coleta de sêmen e sua viabilidade a partir da inseminação artificial.

## 2. Metodologia

O trabalho foi desenvolvido no Núcleo Integrado de Pesquisas Avícolas (NIPA) da Universidade Federal de Santa Maria, *campus* Palmeira das Missões, localizado no município de Palmeira das Missões – RS. O laboratório possui um setor de coturnicultura, com uma sala de 16 m<sup>2</sup>, contendo gaiolas de arrame liso, com dimensões de 100 x 30 x 16 cm (frente, profundidade e altura), água disponível, por bebedouros automático tipo *nipple*, temperatura e luz controlada.

O experimento foi conduzido, com a utilização de 2 métodos de coleta (metodologias de reprodução), sendo eles: M1 = Massagem abdominal no macho e M2 = Massagem abdominal na fêmea após a copula do macho, com 6 repetições por métodos testados.

No desenvolver do trabalho foram utilizados 13 machos da espécie *Coturnix coturnix coturnix*. Os machos foram anilhados, numerados e submetidos a um teste de fertilidade. Os machos foram testados quanto ao percentual de eclosão dos ovos após acasalamento por monta natural durante o período de 24 horas. Os ovos foram coletados durante os 5 dias subsequentes para incubação por 18 dias.

Os 2 machos que apresentaram índices de fertilidade mais altos (dados observados: 100 e 75 %), foram selecionados para utilização nos tratamentos, alojados em duas gaiolas individuais. Os demais foram descartados. Os machos selecionados tiveram sua distribuição de forma aleatória entre os 2 métodos de coleta, os machos foram alojados separadamente com o intuito de evitar que os mesmos realizem cópulas entre si, diminuindo o seu volume espermático.

Foram escolhidas aleatoriamente 16 codornas fêmeas da linhagem *Coturnix coturnix coturnix*. Para a alimentação das fêmeas, foram fornecidas 30g/dia/animal de ração comercial para fase de postura, seguindo as recomendações nutricionais para codornas europeias em fase de postura (PB 22%, EM de 2.900 kcal/kg), de acordo com Silva & Costa (2009). Todas as aves foram submetidas a um programa de luz de 16 h/dia durante o experimento, alternando entre luz natural e artificial.

As fêmeas tiveram sua divisão em 8 fêmeas para cada metodologia de coleta do sêmen, e alojadas em dupla nas gaiolas (compondo oito repetições por metodologia, totalizando 16 gaiolas). Quatro fêmeas, anteriormente selecionadas, foram utilizadas como manequim, para ajudar nas coletas da metodologia 2 (estas quatro fêmeas foram alojadas todas em uma única gaiola, recebendo a mesma ração e manejos básicos dos demais animais).

A composição do estudo utilizou dois métodos, com base em informações da literatura sobre reprodução de codornas, e posterior incubação dos ovos coletados pelo período de 18 dias, em incubadora artificial (36,5° C e 70 % de umidade):

Método 1: massagem abdominal para coleta de sêmen em machos - é uma técnica que leva a contenção do macho para que o mesmo seja massageado na região dorsal de forma que a mão do pesquisador fique posicionada na parte inferior das asas, realizando movimentos firmes e rápidos em direção a cauda.

O macho responde com tumescência (ereção) do falo e nesse momento o pesquisador comprime a cloaca expondo líquido espermático excretado pela papila externa do ducto deferente, coletando este líquido (de consistência espumosa) com o auxílio de um recipiente, esta técnica é adaptada da reprodução de galos, de acordo com Rosa et al. (1995). Com o sêmen no recipiente é efetuada em seguida a inseminação das seis fêmeas, alojadas em duplas nas suas respectivas gaiolas.

Método 2: massagem abdominal na fêmea - foram alojadas duas fêmeas manequins na gaiola do macho do respectivo tratamento por um período médio de 30 minutos ou até o macho fazer a cópula no manequim, permitindo que a cópula seja efetuada pelo método de monta natural do macho.

Após a observação da monta natural foi procedido a massagem das genitais destas fêmeas, semelhante ao processo realizado com o macho da metodologia 1, e em seguida foi retirado o líquido depositado pelo macho. O líquido expelido através da massagem feita no manequim foi destinado para a inseminação das 8 fêmeas que são destinadas para inseminação deste tratamento, (visto que estas fêmeas não possuem contato direto com o macho, para dar uma maior confiabilidade aos resultados).

Para verificar a eficiência nas coletas de sêmen, o líquido seminal advindo das coletas, foi ministrado na região da vagina das fêmeas de cada método, utilizando-se uma seringa plástica de insulina 1 ml, diferente para cada repetição, dentro de um período máximo de 10 minutos após a coleta, independente da metodologia.

As coletas de sêmen e inseminações foram realizadas em um período total de 10 dias (dividido em 2 incubações, sendo uma a cada 5 dias, para manter a viabilidade embrionária

dos ovos). Após os 5 dias de coletas de sêmen e inseminações, os ovos produzidos foram incubados de forma separada por metodologia aplicada.

Os ovos coletados foram armazenados em sala com ambiente controlado com 18°C de temperatura e máximo de 70% de umidade relativa do ar. Os ovos foram introduzidos em uma chocadeira comercial (temperatura controlada de 36,5°C e umidade relativa do ar constante em 70%), sendo incubados por 18 dias. Ao completar o ciclo de 18 dias de incubação, foram medidos os percentuais de eclosão dos ovos ( $\text{total de ovos férteis} * 100 / \text{total de ovos incubados por repetição}$ ). Já os ovos não eclodidos foram submetidos ao embriodiagnóstico para verificação da existência ou não da fecundação. Os resultados de cada incubação foram utilizados para compor a média de cada repetição do percentual de ovos férteis (%).

Foi realizado o abate de 2 machos, através do deslocamento cervical, e feita a coleta dos testículos para a detecção dos espermatozoides no macho, através de cortes histológicos feitos no sistema reprodutivo, com a finalidade de realizar a identificação e localização dos mesmos.

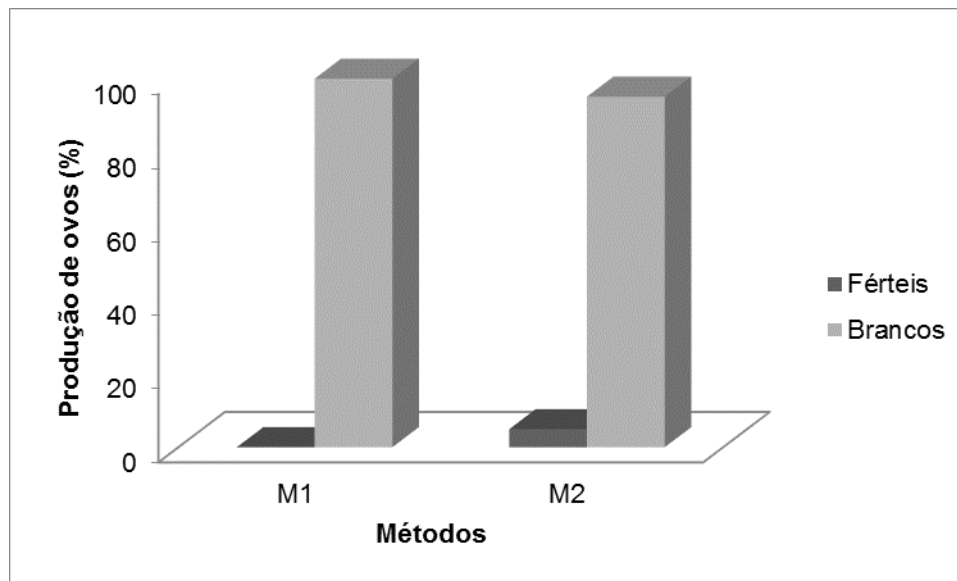
Os cortes foram feitos transversalmente, dos testículos, cauda do epidídimo, ducto deferente e par de papilas dos ductos deferentes. As amostras do sistema reprodutivo foram submetidas ao processamento histológico através da desidratação, e posterior clarificação, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo com a espessura de 5 micrometros. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e analisadas em microscópio ótico com programa analisador de imagens Axion Vision. Os cortes foram fotografados utilizando-se o fotomicroscópio Nikon eclipse E600.

Os dados obtidos foram transformados em frequências relativas através de planilhas do programa Excel para melhor visualização dos resultados. Conjugando, portanto, uma análise descritiva das variáveis.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Os resultados das duas metodologias de coleta e inseminação que foram aplicadas em codornas europeias são apresentados no gráfico 1. O método 1, que consistia em massagem abdominal realizada no macho e coleta do conteúdo expelido pela glândula para cloacais com posterior aplicação nas fêmeas, não apresentou resultados satisfatórios pois, dos 49 ovos incubados, nenhum apresentou fertilidade pós período de incubação de 18 dias.

Gráfico 1- Total de ovos férteis e inférteis (brancos) em relação ao total de ovos produzidos por diferentes métodos de IA em codornas de corte *Coturnix coturnix coturnix*.



M1 = massagem abdominal no macho; M2 = massagem abdominal na fêmea.

A possível explicação para os resultados apresentarem 100% de ovos brancos no método 1 é devido a não existência de tumescência e posterior ejaculação quando executada a massagem abdominal nos machos de codornas, lembrando que os espermatozoides das aves são imóveis antes da ejaculação. Assim, com o impulso próprio da ejaculação, os espermatozoides se tornam um veículo de liberação de DNA, conforme indicado por Orsi et al. (2007).

Assim, a massagem abdominal não tem pressão suficiente como a exercida durante a ejaculação não dando viabilidade aos espermatozoides. Outro fator decorrente que pode ser averiguado, é a utilização de apenas matrizes de primeira geração (F1), se deve utilizar machos de outro criatório ou matrizeiro, de modo a evitar consanguinidade que poderia resultar em redução na produção de ovos e índices de fertilidade e eclodibilidade.

Já no método 2, que consistia de execução da monta natural dos machos nas fêmeas manequins, com posterior massagem nestas fêmeas para coleta do conteúdo depositado pelos machos na cloaca e aplicação em novas fêmeas, obteve-se um total de 4,88% de fertilidade (Gráfico 1). O resultado obtido neste método abre a possibilidade de aprimoramento desta técnica para aplicação de forma comercial, pois, como foi observada fertilidade em alguns ovos, fica claro que houve a passagem de espermatozoides para as fêmeas, necessitando de mais estudos para viabilizar a fertilidade pelo método aplicado.



A partir do estudo que foi realizado é possível pontuar alguns quesitos que podem ser aprimorados na execução do método 2 em estudos futuros, como por exemplo: (i) maior tempo de exposição dos machos com as fêmeas manequins, para que seja possível a execução dos cortejos dos machos sobre as fêmeas viabilizando os picos hormonais necessários; (ii) altura considerável das gaiolas para que tenha espaço suficiente para execução da cópula; (iii) temperatura do local de execução para viabilizar a transferência do esperma entre as fêmeas, tendo em vista que os espermatozoides tem uma melhor sobrevivência em temperaturas de 7,2 a 12,8°C, que quando mantidos nos extremos de muito calor ou muito frio, de modo que devemos evitar no ato da coleta o resfriamento excessivo do sêmen.

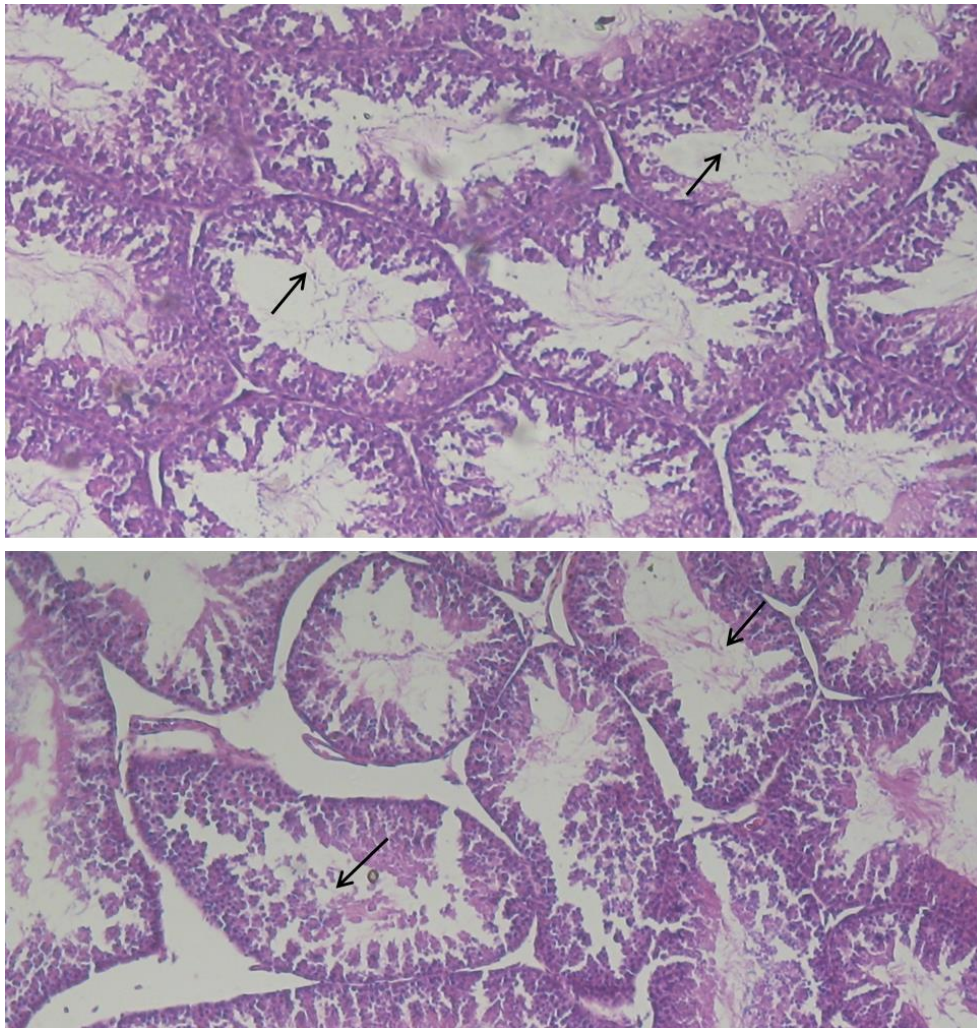
Bakst & Bauchan (2015) dão ênfase de que no método de inseminação artificial, devem-se inseminar galinhas no período da tarde, assim reduzindo as chances de encontrar um ovo com casca já formada na região uterina, facilitando o resultado em fertilidade elevada, pois se a inseminação ocorrer no momento que antecede a ovo posição nas fêmeas que irão receber o esperma, a passagem do espermatozoide pode ser dificultada.

Em codornas, assim como nas demais aves, o aparelho reprodutivo dos machos é composto por testículos, epidídimos e ductos deferentes. Nas Figuras 1, 2 e 3 é possível observar os cortes histológicos realizados nos machos com a finalidade de proceder à identificação e localização dos mesmos.

Segundo Lanna et al. (2013) entre machos de mesma espécie e linhagem, é similar a produção diária de espermatozoides por grama de testículo, sendo que o tamanho testicular é altamente variável entre indivíduos, proporcionando diferença na produção espermática diária.

Na Figura 1 é possível visualizar a identificação e localização de espermatozoides no testículo de codornas europeias. Amoroso et al. (2008), avaliando aspectos reprodutivos em codornas japonesas, verificou que o pico de atividade espermatogênica ocorreu entre 15<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> semanas.

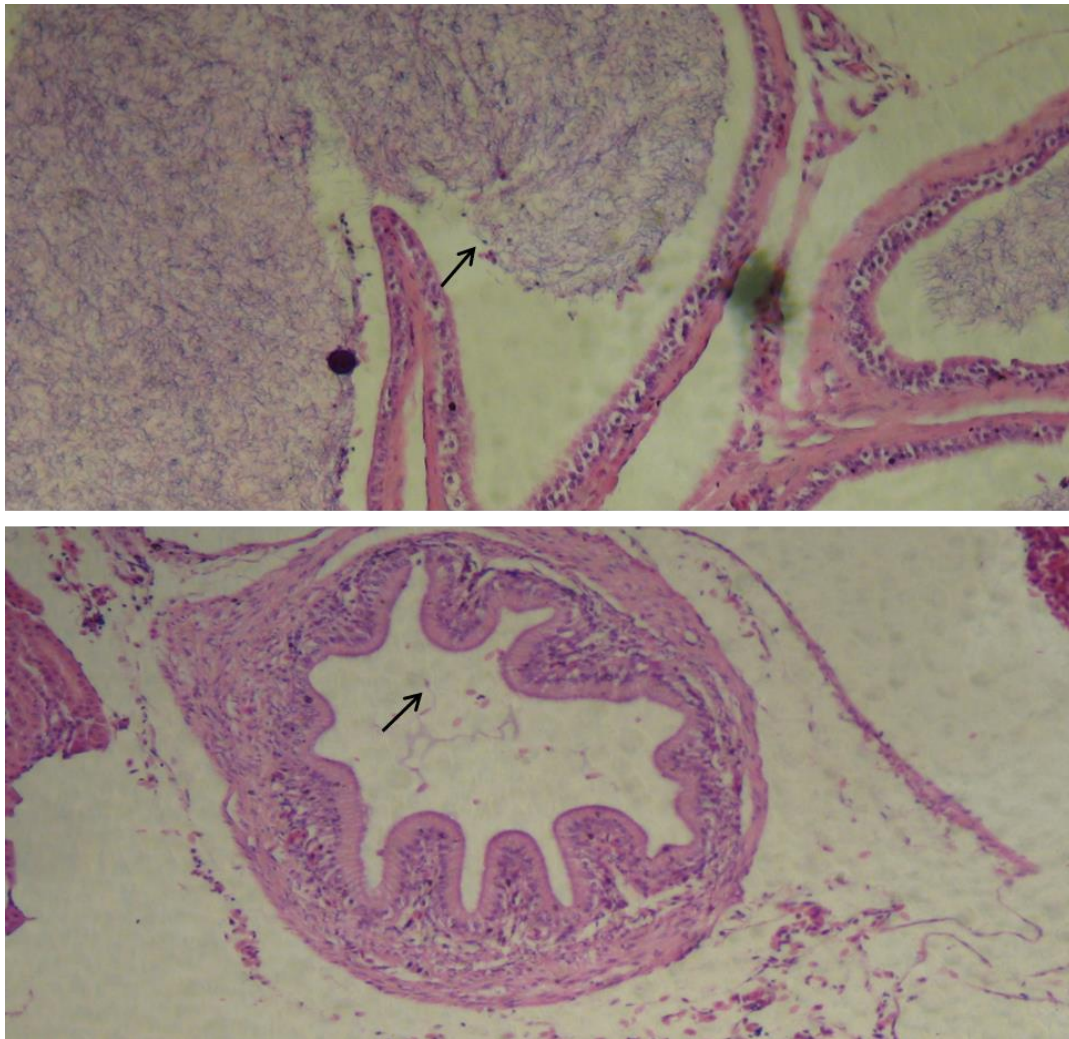
Figura 1 - Identificação e localização de espermatozoides nos testículos de codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*).



Após o espermatozoide ser formado nos testículos, de acordo com Melo et al. (2018), o sêmen, antes da sua ejaculação, é estocado no ducto deferente. Na figura 2 é possível visualizar a identificação e localização de espermatozoides no ducto deferente de codornas europeias. Em galinhas, mais de 90% da reserva de espermatozoides extra gonadais é contida dentro do ducto deferente (Melo et al. 2018).

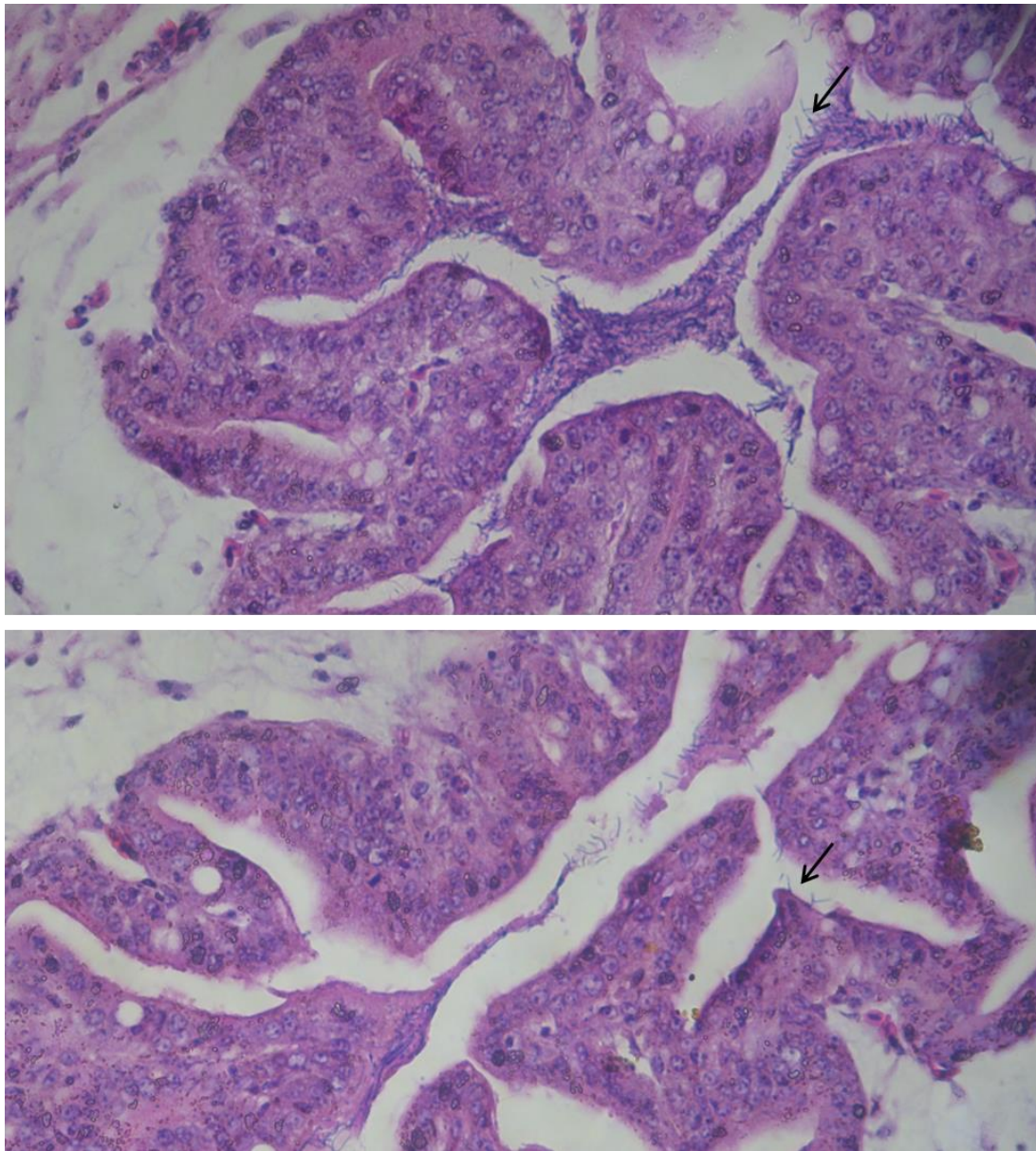
Franzo et al. (2008) discorrem que o epidídimo em aves é uma estrutura de importância no transporte e estágios do metabolismo de espermatozóides, O epidídimo de galos (*Gallus gallus domesticus*) é funcionalmente importante no transporte dos espermatozóides, na secreção e reabsorção dos fluidos e na remoção de espermatozóides degenerados (Franzo & Vulcani, 2010).

Figura 2 - Identificação e localização de espermatozoides no ducto deferente de codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*).



Os ductos deferentes terminam dentro da cloaca como papilas, sendo estas, pequenas projeções originadas da parede lateral da cloaca. De acordo com Du et al. (2017), as papilas correspondem ao órgão copulador do macho. A identificação e localização de espermatozoides nas papilas dos ductos deferentes de codornas europeias podem ser visualizadas na Figura 3.

Figura 3 - Identificação e localização de espermatozoide nas papilas dos ductos deferentes de codornas europeias (*Coturnix coturnix coturnix*).



Amoroso et al. (2008) relata que a organização anatômica e histológica do testículo da codorna é semelhante à do galo doméstico e do pombo, ainda que a forma dos testículos seja análoga, o testículo esquerdo é maior que o direito. Burrows & Quinn (1973) demonstraram um método não invasivo, o método da massagem abdominal para fazer a coleta de sêmen dos machos de galináceos. Esta técnica envolve em conter o macho e gentilmente massageá-lo na altura do dorso da ave, movimentos leves direcionados da parte de trás das asas até a cauda com massagens firmes e rápidas. Porém na produção de codornas, esta técnica não foi eficaz.

A aplicação da técnica de IA tem enorme potencial se aplicada para aves em geral, devido ao controle sobre a reprodução e à sua relativa simplicidade. No entanto, a aplicação comercial tem uma restrição a alguns núcleos de reprodução da avicultura industrial. Se as condições apresentarem ótimas instalações e manejo, espera-se da técnica de IA uma melhoria nos índices de fertilidade. Porém, a utilização ou não da técnica está sujeita a uma análise econômica, feita pelo balanço entre suas vantagens e desvantagens em relação ao acasalamento natural (Kang et al. 2016).

Sasanami et al. (2015) relatam que a aplicação da IA, quando comparada à monta natural, apresenta algumas vantagens como eliminação de acasalamento preferencial, a reprodução de linhagens comerciais de monta difícil ou impossível, diminuição do número de machos pelo mesmo de fêmeas (redução de 7- 10% para 2- 3%), maior descendência dos machos de alto valor genético levando a um maior progresso de seleção, elevação os níveis de fertilidade garantindo que todas as fêmeas foram inseminadas.

## CONCLUSÕES

Os métodos utilizados na coleta de sêmen e inseminações artificiais aplicados obtiveram índices indesejáveis, logo apresentando-se métodos não viáveis, como forma de manejo reprodutivo em codornas. Em estudos futuros e com o aperfeiçoamento da técnica utilizada no método 2, acredita-se que apresentara resultados desejáveis. A realização dos cortes histológicos mostrou-se eficiente na identificação e localização dos espermatozoides no aparelho reprodutor masculino de codornas europeias.

## Referências

Amoroso, L., Artoni, S. M. B., Moraes, V. M. B., Perecin, D., Franzo, V. S., & Amoroso, P. (2008). Influência da espermatogênese e dos níveis de testosterona no aspecto reprodutivo de codornas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 61-66.

<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v37n1/v37n1a08>

Araújo Góes, P. A., da Silva Cavalcante, A. K., Tavian, A. F., Felipe, L., Santos, E. C., Nichi, M., ... & Barnabe, V. H. (2011). Análise espermática de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 48(5), 370-377. <https://doi.org/10.11606/S1413-95962011000500003>

Bakst, M. R., & Bauchan, G. (2015). Apical blebs on sperm storage tubule epithelial cell microvilli: Their release and interaction with resident sperm in the turkey hen oviduct. *Theriogenology*, 83(9), 1438-1444. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.016>

Bittencourt, T. M., Lima, H. J. D. A., Valentim, J. K., Martins, A. C. D. S., Moraleco, D. D., & Vaccaro, B. C. (2019). Distillers dried grains with solubles from corn in diet of japanese quails. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 41. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v41i1.42749>

Bongalhardo, D. C. (2013). Produção e preservação do sêmen de galos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 37(2), 131-135. [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag131-135%20\(RB469\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag131-135%20(RB469).pdf)

Burrows, W. H., & Quinn, J. P. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, 16(1), 19-24. <https://doi.org/10.3382/ps.0160019>

Carvalho, J. S., Cavalcanti, M. O., Chaves, M. S., & Rizzo, H. (2019). Eficiência da inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas zebuínas na mesorregião Sudeste do Pará, Brasil. *Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 62. <http://btcc.ufra.edu.br/index.php/ajaes/article/view/2977>

Du, Z. H., Xia, J., Sun, X. C., Li, X. N., Zhang, C., Zhao, H. S., ... & Li, J. L. (2017). A novel nuclear xenobiotic receptors (AhR/PXR/CAR)-mediated mechanism of DEHP-induced cerebellar toxicity in quails (*Coturnix japonica*) via disrupting CYP enzyme system homeostasis. *Environmental Pollution*, 226, 435-443. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.015>

Franzo, V. S., Baraldi-Artoni, S. M., Oliveira, D., Vulcani, V. A. S., & Sagula, A. (2008). Elétron-micrografia do epidídimo de codornas japonesas (*coturnix coturnix japonica*) em período de reprodução. *Nucleus*, 5(2), 1-10. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4033514>

Franzo, V. S., & Vulcani, V. A. S. (2010). Epidídimo e testículo de aves: Revisão literária. PUBVET, 4, Art-850. <http://www.pubvet.com.br/artigo/2305/p-styletext-align-justify-aligncenterstrongepidiacutedimo-e-testiacuteculo-de-aves-revisatildeo-literaacuteriastrongp>

Melo, L. D., Cruz, F. G. G., Rufino, J. P. F., Melo, R. D., da Costa Feijó, J., & Costa, A. P. G. C. (2018). TURNOS DE COLETA E PERÍODOS DE TRANSFERÊNCIA DE OVOS DE MATRIZES SEMIPESADAS SOBRE PROCESSOS DE INCUBAÇÃO ARTIFICIAL. Archives of Veterinary Science, 23(2). <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/48477>

Getachew, T. (2016). A review article of artificial insemination in poultry. World's Veterinary Journal, 6(1), 26-35. [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46403786/World\\_Vet](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46403786/World_Vet)

Kang, K. S., Park, T. S., Rengaraj, D., Lee, H. C., Lee, H. J., Choi, H. J., ... & Han, J. Y. (2016). Fertilisation of cryopreserved sperm and unfertilised quail ovum by intracytoplasmic sperm injection. Reproduction, Fertility and Development, 28(12), 1974-1981. <http://www.publish.csiro.au/rd/RD15126>

Lanna, L. L., Soares, F. A., Santos, T. M., Oliveira, J. N., & Marques-Júnior, A. P. (2013). Gonadosomatic index and correlations between testicular dimensions and weight in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) at 60 days old. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 65(4), 955-960. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352013000400003>

Orsi, A. M., Domeniconi, R. F., Simões, K., Stefanini, M. A., & Baraldi-Artoni, S. M. (2007). Variabilidade sazonal no ducto epididimário de codorna doméstica: observações morfológicas. Pesquisa Veterinária Brasileira, 495-500. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2007001200005>

Pastore, S. M., Oliveira, W. D., & Muniz, J. C. L. (2012). Panorama da coturnicultura no Brasil. Revista Eletrônica Nutritime, 9(6), 2041-2049.

Rosa, A. P., Paganini, F. J., Vieira, N. S., & Paloschi, J. L. (1995). Effect of intervals and stresses of artificial insemination on broiler breeder females production and fertility. Ciência Rural, 25(3), 443-447. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781995000300020>

Sasanami, T., Izumi, S., Sakurai, N., Hirata, T., Mizushima, S., Matsuzaki, M., ... & Tsutsui, K. (2015). A unique mechanism of successful fertilization in a domestic bird. *Scientific reports*, 5, 7700. <https://www.nature.com/articles/srep07700>

Silva, J. D., & Costa, F. G. P. (2009). Tabela para codornas japonesas e europeias. Jaboticabal, SP: Funep, 110.

Colocar espaço entre uma referência e outra. Lembre que usamos APA.

### **Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Felipe Cardoso Serpa – 50%

Ianglio Márcio Travassos Jácome – 10%

Rodrigo Garófallo Garcia – 5%

Leonardo Faccenda Zanchin – 5%

Ezequiel Somavilla Manfio – 5%

Mabel Molinari – 10%

Jean Kaique Valentim – 5%

Maria Fernanda de Castro Burbarelli – 5%

Bruna Barreto Przybulinski – 5%