

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DA MATURIDADE SEXUAL COM BASE NAS  
CARACTERÍSTICAS HISTOMORFOLÓGICAS DOS  
TESTÍCULOS E QUALIDADE ESPERMÁTICA EM PERDIZES  
(*Rhynchotus rufescens*)**

**Jeisson Alexander Leon Rubio**

**Médico veterinário**

**2024**

**D  
I  
S  
S.**

**/**

**R  
U  
B  
I  
O**

**J.  
A.  
L.**

**2  
0  
2  
4**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DA MATURIDADE SEXUAL COM BASE NAS  
CARACTERÍSTICAS HISTOMORFOLÓGICAS DOS  
TESTÍCULOS E QUALIDADE ESPERMÁTICA EM PERDIZES  
(*Rhynchotus rufescens*)**

**Discente: Jeisson Alexander Leon Rubio**

**Orientador: Prof. Dr. Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva**

**Coorientadora: Profa. Dra. Kelry Mayara Da Silva**

**Coorientador: Prof. Dr. Pablo Domínguez Castaño**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**2024**

L585e

Leon Rubio, Jeisson Alexander

Estudo da maturidade sexual com base nas características histomorfológicas dos testículos e qualidade espermática em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) / Jeisson Alexander Leon Rubio. -- Jaboticabal, 2024

61 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva

Coorientadora: Kelry Mayara Silva

1. Reprodução. 2. Tinamiformes. 3. Eletroestimulação. 4. Espermatozoide. 5. Testículos. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ESTUDO DA MATURIDADE SEXUAL COM BASE NAS CARACTERÍSTICAS HISTOMORFOLÓGICAS DOS TESTÍCULOS E QUALIDADE ESPERMÁTICA EM PERDIZES (*Rhynchotus rufescens*)

**AUTOR: JEISSON ALEXANDER LEON RUBIO**

**ORIENTADOR: JOSINEUDSON AUGUSTO II DE VASCONCELOS SILVA**

**COORIENTADOR: PABLO DOMINGUEZ CASTAÑO**

**COORIENTADORA: KELRY MAYARA DA SILVA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, área: Genética e Melhoramento Animal pela Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente

**JOSINEUDSON AUGUSTO II DE VASCONCELOS**

Data: 14/08/2024 20:46:41-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOSINEUDSON AUGUSTO II DE VASCONCELOS SILVA (Participação Virtual)  
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente

Pesquisador Dr. FABIO MORATO MONTEIRO  
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP



**FABIO MORATO MONTEIRO**

Data: 13/08/2024 09:36:36-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. FABIANA FERREIRA DE SOUZA (Participação Virtual)  
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FMVZ UNESP Botucatu



Documento assinado digitalmente

**FABIANA FERREIRA DE SOUZA**

Data: 14/08/2024 10:06:18-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 12 de agosto de 2024

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**JEISSON ALEXANDER LEON RUBIO** – filho de Luis Antonio León Carvajal e Maria Ofelia Rubio Mendoza. Nasceu em 25 de maio de 1999, no município de Madrid (Cundinamarca-Colômbia). Em agosto de 2016, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Fundación Universitaria Agraria de Colômbia – UNIAGRARIA na cidade de Bogotá, Colômbia. De setembro de 2021 a março de 2022, realizou estágio curricular de conclusão de curso na Avidesa Mac Pollo (Santander-Colômbia). Graduou-se como Médico Veterinário em abril de 2022 com o projeto intitulado “Análisis genealógico en la población abierta de caballos Silla Argentino pertenecientes a la Policía Nacional de Colombia” sob orientação do Prof. Dr. Pablo Dominguez Castaño. Em agosto de 2022, ingressou no programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da FCAV/UNESP, Câmpus Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva. Durante o mestrado foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## Apoio Financeiro

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>2</b>
2.1. Geral.....	2
2.2. Específicos .....	2
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
3.1. Perdiz ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ).....	3
3.2. Reprodução.....	3
3.3. Anatomia e histologia reprodutiva masculina das aves .....	4
3.4. Fisiologia reprodutiva masculina das aves .....	6
3.5. Coleta de sêmen .....	7
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
4.1. Declaração de ética.....	8
4.2. Animais.....	8
4.3. Coleta dos testículos .....	9
4.4. Análise de histomorfometria testicular.....	10
4.4.1. Proporção volumétrica de túbulo seminífero e tecido intersticial .....	10
4.4.2. Diâmetro tubular e espessura do epitélio seminífero .....	10
4.5. Coleta do sêmen .....	10
4.6. Análise do sêmen.....	13
4.7. Análise estatística.....	14
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>14</b>
5.1. Morfometria testicular .....	15
5.2. Histomorfometria testicular .....	18
5.3. Coleta do sêmen .....	23
5.4. Análise do sêmen .....	23
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	<b>34</b>
<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>42</b>

Figura 1A. Fotografias dos testículos de perdizes ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) em diferentes fases de crescimento .....	43
Figura 2A. Fotografias histológicas dos testículos da perdiz ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) durante o crescimento entre 1 e 6 meses de idade em estação não reprodutiva.....	44
Figura 3A. Fotografias histológicas dos testículos da perdiz ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) durante o crescimento entre 7 e 10 meses de idade em estação não reprodutiva.....	45
Figura 4A. Fotografias histológicas dos testículos da perdiz ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) durante o crescimento entre 9 e 12 meses de idade em estação reprodutiva.....	46
<b>APÊNDICE B</b> .....	47
Tabela 1B. Média $\pm$ desvio padrão dos pesos corporais, pesos testiculares e índice gonadossomático (IGS) de perdizes ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) durante o crescimento.....	48
Tabela 2B. Variação histomorfométrica dos testículos da perdiz ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) durante o crescimento.....	49

## A T E S T A D O

**Atesto** que o subprojeto intitulado “**ESTUDO DA MATURIDADE SEXUAL COM BASE NAS CARACTERÍSTICAS HISTOMORFOLÓGICAS DOS TESTÍCULOS E QUALIDADE ESPERMÁTICA EM PERDIZES (Rhynchotus Rufescens)**” faz parte do Projeto “**Avaliação do desempenho reprodutivo e de crescimento de perdizes (Rhynchotus rufescens) oriundas de reprodutores selecionados por índice de seleção fenotípico**”, Protocolo CEUA 083/2020, aprovado em 17 de junho 2020, a ser conduzido por **Jeisson Alexander León Rubio**, orientado pelo **Prof. Dr. Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva**, para fins de pesquisa científica, e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Botucatu, 12 de junho de 2023.



**JULIANY GOMES QUITZAN**  
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

**CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

R. Prof. Dr. Walter Mauricio Corrêa, s/n, UNESP – Câmpus de Botucatu – Botucatu SP Brasil - CEP 18618-681  
Tel. +55 (14) 3880 2152 | [www.fmvz.unesp.br](http://www.fmvz.unesp.br) | [ceua.fmvz@unesp.br](mailto:ceua.fmvz@unesp.br)

## ESTUDO DA MATURIDADE SEXUAL COM BASE NAS CARACTERÍSTICAS HISTOMORFOLOGICAS DOS TESTÍCULOS E QUALIDADE ESPERMÁTICA EM PERDIZES (*Rhynchotus rufescens*)

**RESUMO** – O objetivo do presente estudo foi determinar, por meio da análise das características histomorfológicas dos testículos, a idade em que ocorre a maturidade sexual, bem como analisar a qualidade do sêmen coletado por meio de eletroestimulação em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) jovens. Um total de 44 perdizes machos foram utilizadas na pesquisa, divididas em dois grupos. O primeiro grupo, conformado por 34 perdizes, documentou as alterações no desenvolvimento do peso corporal (PC), morfometria e histomorfometria dos testículos do primeiro ao decimo segundo mês de idade, no período de novembro de 2022 a novembro de 2023. A coleta dos testículos foi realizada após a eutanásia dos animais, utilizando a técnica de deslocamento cervical. A morfometria testicular incluiu os seguintes parâmetros: peso testicular (PT), comprimento e largura testicular. Os parâmetros de histomorfometria testicular (proporção tubular, diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero) foram determinados por meio do software ImageJ. O segundo grupo foi composto por 10 animais, com idades entre nove e doze meses, em outubro e novembro de 2023, utilizados para coleta de sêmen por meio de eletroestimulação e analisado quanto ao grau de contaminação, volume, motilidade subjetiva, vigor, concentração espermática, viabilidade e defeitos morfológicos. A partir do quinto mês de idade os indivíduos alcançaram PC semelhante com o observado em perdizes macho na fase adulta. A maturidade sexual foi evidenciada pela espermatogênese completa na histologia dos testículos de animais com dez meses de idade em estação não reprodutiva, bem como em animais que atingiram a idade de nove meses em estação reprodutiva. A média do PT, comprimento testicular, largura testicular, índice gonadossomático (IGS), proporção tubular, volume tubular, diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero para indivíduos com dez meses em estação não reprodutiva foi de 0,20g, 10,52mm, 5,59mm, 0,05%, 77,16%, 0,31cm<sup>3</sup>, 160,04µm e 57,36µm, respectivamente. Para os indivíduos com nove meses em estação reprodutiva, os valores médios foram de 1,92g, 24,45mm, 13,86mm, 0,55%, 84,82%, 3,26cm<sup>3</sup>, 343,49µm, 99,17µm, respectivamente. A taxa de sucesso na coleta por meio de eletroestimulação alcançou 75%. Na avaliação do sêmen, os valores médios do volume, motilidade, vigor, concentração espermática, viabilidade e defeitos morfológicos foram: 14,94µl, 65,97%, 3,45, 1,49 x 10<sup>9</sup> espermatozoides/ml, 85,96% e 45,91%, respectivamente. Concluímos que a morfometria e histomorfometria testicular das perdizes sofrem mudanças significativas com o avanço da idade e são influenciadas pelo fotoperíodo, e que a técnica de eletroestimulação para coleta de sêmen em perdizes jovens e não condicionadas demonstrou ser segura e altamente eficaz. Ademais, a confirmação da produção de gametas funcionais em perdizes jovens reforça o potencial uso desses animais em programas de reprodução assistida, ampliando as oportunidades para os criatórios com fins comerciais e de conservação.

**Palavras-chave:** Tinamiformes, desenvolvimento reprodutivo, túbulos seminíferos, eletroestimulação, espermatozoide.

**STUDY OF SEXUAL MATURITY BASED ON HISTOMORPHOLOGICAL  
CHARACTERISTICS OF THE TESTES AND SPERM QUALITY IN PARTRIDGES  
(*Rhynchotus rufescens*)**

**ABSTRACT** – The aim of this study was to determine, through the analysis of the histomorphological characteristics of the testes, the age at which sexual maturity occurs, as well as to analyze the quality of semen collected by means of electrostimulation in young partridges (*Rhynchotus rufescens*). A total of 44 male partridges were used in the research, divided into two groups. The first group, consisting of 34 partridges, documented the changes in the development of body weight (BW), morphometry and histomorphometry of the testes from the first to the twelfth month of age, in the period from November 2022 to November 2023. The collection of the testes was performed after euthanasia of the animals, using the cervical dislocation technique. Testicular morphometry included the following parameters: testicular weight (TW), testicular length and width. The testicular histomorphometry parameters (tubular proportion, tubular diameter and height of the seminiferous epithelium) were determined using the ImageJ software. The second group consisted of 10 animals, aged between nine and twelve months, in October and November 2023, used for semen collection through electrostimulation and analyzed for the degree of contamination, volume, subjective motility, vigor, sperm concentration, viability and morphological defects. From the fifth month of age, the individuals reached PC like that observed in male partridges in the adult phase. Sexual maturity was evidenced by complete spermatogenesis in the histology of the testes of animals at ten months of age in the non-reproductive season, as well as in animals that reached the age of nine months in the reproductive season. The mean PT, testicular length, testicular width, gonadosomatic index (GSI), tubular proportion, tubular volume, tubular diameter and seminiferous epithelium height for individuals with ten months in the non-reproductive season were 0.20 g, 10.52 mm, 5.59 mm, 0.05%, 77.16%, 0.31 cm<sup>3</sup>, 160.04 µm and 57.36 µm, respectively. For individuals with nine months in the reproductive season, the mean values were 1.92 g, 24.45 mm, 13.86 mm, 0.55%, 84.82%, 3.26 cm<sup>3</sup>, 343.49 µm, 99.17 µm, respectively. The success rate in collection by electrostimulation reached 75%. In the semen evaluation, the mean values of volume, motility, vigor, sperm concentration, viability and morphological defects were: 14.94 µl, 65.97%, 3.45, 1.49 x 10<sup>9</sup> sperm/ml, 85.96% and 45.91%, respectively. We conclude that the testicular morphometry and histomorphometry of partridges undergo significant changes with advancing age and are influenced by the photoperiod, and that the electrostimulation technique for semen collection in young and unconditioned partridges proved to be safe and highly effective. Furthermore, confirmation of the production of functional gametes in young partridges reinforces the potential use of these animals in assisted reproduction programs, expanding opportunities for commercial and conservation breeding farms.

**Keywords:** Tinamiformes, reproductive development, seminiferous tubules, electrostimulation, spermatozoa.

**LISTA DE ABREVIações**

cm <sup>3</sup>	Centímetro cúbico
EM	Energia Metabolizável
FSH	Hormônio folículo-estimulante
g	grama
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
IGS	Índice gonadossomático
INT	Tecido Intersticial
Kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma
l	Litro
LH	Hormônio Luteinizante
m	Metro
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
mm	Milímetro
PC	Peso Corporal
PT	Peso Testicular
TS	Túbulos Seminíferos
V	Volt
μ	Micro
°C	Graus Celsius

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1. Correlações entre peso corporal, parâmetros de morfometria e histomorfometria dos testículos da perdiz ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) durante o crescimento.....	21
Tabela 2. Análise espermático de perdizes ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) de 9 a 12 meses de idade, coletados por meio de eletroestimulação na estação reprodutiva.....	25
Tabela 3. Avaliação da morfologia espermática em perdizes ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) de 9 a 12 meses de idade, coletados por meio de eletroestimulação na estação reprodutiva.....	26

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Desenho experimental .....	9
Figura 2. Técnica de coleta de sêmen por meio de eletroestimulação em perdizes ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ).....	13
Figura 3. Evolução do peso corporal, peso testicular e índice gonadossomático em perdizes ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) durante o crescimento.....	17
Figura 4. Evolução do comprimento e largura testicular em perdizes ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) durante o crescimento.....	18
Figura 5. Variação histomorfométrica dos testículos de perdizes ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ) durante o crescimento.....	22
Figura 6. Teste de coloração supravital em espermatozoides de perdizes ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ).....	26
Figura 7. Defeitos morfológicos de espermatozoides de perdizes ( <i>Rhynchotus rufescens</i> ).....	27

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos aspectos de maior importância no processo de conservação dos animais de vida silvestre é a reprodução. Para estar apto a reprodução o animal passa por processos distintos atingindo as fases de desenvolvimento, iniciando com a formação do trato reprodutivo, produção de gametas, manifestação de comportamentos sexuais e a capacidade da concepção. Nas aves, a formação do trato reprodutivo acontece antes da eclosão, e a produção de gametas está associado à idade, bem como as características de crescimento corporal, concentração de hormônios e efeitos ambientais (Garamszegi et al., 2005).

A perdiz (*Rhynchotus rufescens*), pertencente à família *Tinamidae*, é uma espécie silvestre com distribuição restrita à América do Sul, sendo considerado o maior tinamídeo do Brasil. Seu papel ecológico envolve a dispersão de sementes e o controle das populações de insetos devido a sua alimentação (Sick, 1997). Além disso, a perdiz é uma espécie classificada como cinegética, frequentemente utilizada pelas populações rurais como fonte de alimento e alvo comum de caçadores (Correia, 2017). Esta pressão cinegética tem contribuído para a diminuição de suas populações, como indicado pela Red List da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2023). A conservação dessa espécie é, portanto, de grande importância tanto ecológica quanto cultural.

Uma opção sustentável, capaz de gerar renda é a implantação de criatórios comerciais de animais silvestres, alternativa apropriada para manter populações de diversas espécies (Albuquerque et al., 2008). No entanto, para se tornar opção viável, o conhecimento dos diferentes mecanismos das características reprodutivas é necessário para preceder a viabilidade e eficiência reprodutiva da espécie alvo (Comizzoli et al., 2009). Na maioria das espécies de aves, tanto domésticas quanto silvestres, a reprodução é afetada pela sazonalidade e fotoperíodo, ou seja, a luz estimula fotorreceptores que acionam o hipotálamo, gerando ativação do sistema endócrino que controla a maturidade sexual, a função testicular e conseqüentemente as funções reprodutivas (Bruneli et al., 2005).

Devido à carência de informações sobre a biologia reprodutiva das aves silvestres, torna-se essencial contribuir com estudos sobre características estruturais da gônada masculina e a qualidade na produção de espermatozoides. Diferentes

estudos abordando a histologia testicular foram desenvolvidos em diversas espécies de aves domésticas e silvestres (Abdul-Rahman et al., 2018; Vogas, 2010; Revorêdo, 2021; Baraldi-Artoni et al., 2007).

O método de coleta de sêmen por eletroestimulação se apresenta como uma ferramenta útil, uma vez que não requer treinamento ou condicionamento prévio. Seu objetivo é contribuir para a conservação de espécies de aves silvestres, por meio de programas de reprodução que envolvem a inseminação artificial (Frediani et al., 2019).

A conservação da espécie *Rhynchotus rufescens* é necessária, desta forma é importante compreender as características reprodutivas dos machos e criar diretrizes na identificação dos melhores reprodutores. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar a maturidade sexual em perdizes *Rhynchotus rufescens* com base nas mudanças de desenvolvimento na histologia dos testículos, assim como a variabilidade desde o primeiro até o décimo segundo mês de idade e a qualidade espermática dos animais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Estudar a maturidade sexual com base nas características histológicas dos testículos e qualidade espermática em perdizes (*Rhynchotus rufescens*).

### **2.2. Específicos**

- Analisar os tecidos histológicos dos testículos das perdizes, avaliando o desenvolvimento do primeiro até o décimo segundo mês de idade.
- Caracterizar a variabilidade histológica dos testículos em diferentes idades nas perdizes.
- Estabelecer a idade da maturidade sexual de perdizes machos.
- Avaliar a eficácia da eletroestimulação para coleta de sêmen em perdizes jovens não condicionadas em estação reprodutiva.
- Analisar a qualidade espermática por meio de exame andrológico das perdizes com até doze meses de idade.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Perdiz (*Rhynchotus rufescens*)

A perdiz brasileira da espécie *Rhynchotus rufescens* pertence à classe das aves, família *Tinamidae* e gênero *Rhynchotus*. A distribuição geográfica da perdiz se estende desde o nordeste brasileiro até o norte da Argentina e Uruguai. Além disso, sua presença também pode ser observada desde o sudeste de Peru até a Bolívia e leste do Paraguai (Silva, 2020). Vivem em diferentes tipos de ambientes, desde desérticos até úmidos. Sua alimentação na vida livre é a partir de sementes, raízes, frutos e invertebrados. O peso médio dos machos adultos varia entre 600 e 900 g, sendo menor comparado com o peso médio das fêmeas, 815 a 1.040 g aproximadamente (Sick, 1997). São apreciadas por seu valor cinegético e maior rendimento da carcaça em relação ao frango e as características físico-químicas da carne (Silva, 2020).

As perdizes possuem características morfológicas que se assemelham às galinhas. Sua cor castanho claro facilita a camuflagem entre os arbustos, se tornando menos visível na presença de predadores. As perdizes possuem capacidade de voo limitada, caracterizada por voos curtos, devido a sua pouca irrigação das asas, o que é explicado por apresentar o menor tamanho do coração dentre todas as aves, sendo esse bom indicador da potência aeróbica (Sick, 1997; Hillman e Hedrick, 2015).

Um de seus comportamentos associados ao medo é a imobilidade tônica, estado físico que a espécie finge de morta, permitindo sua proteção (Alves, 2012). Além disto, demonstra habilidade de adaptação ao cativeiro, o que favorece seu uso para fins científicos e de conservação (Moro et al., 2006), evitando que seja classificada como ameaçada de extinção, tendo em conta que a diminuição populacional é sua atual situação, conforme o indicado pela *Red List* da União Internacional de Conservação de Recursos Naturais (IUCN, 2023).

#### 3.2. Reprodução

A reprodução nas perdizes (*Rhynchotus rufescens*) é sazonal, ocorrendo entre setembro e março, quando os dias são mais longos no hemisfério sul. Durante esse intervalo de tempo, ocorre estímulo a secreção de gonadotrofinas, hormônios essenciais para o processo reprodutivo. Este período é caracterizado pela vocalização

dos machos, os quais também são responsáveis pela confecção de ninhos, incubação dos ovos e criação de filhotes (Correia, 2021).

O peso médio dos filhotes ao nascer é de 38 g (Carnio et al., 1999; Bruneli et al., 2005; Correia, 2017). De acordo com Correia (2017), o peso do ovo influencia no peso dos filhotes ao nascer, apresentando correlação de 0,42 ( $p < 0,01$ ). Essa correlação por sua vez, tem relação direta com o ganho de peso até a idade adulta, bem com a maturidade sexual (Moro et al., 2002).

Nas aves, observam-se diversos sistemas de acasalamento. O mais comum é a monogamia, no qual um indivíduo se relaciona unicamente com um parceiro e permanece durante uma estação reprodutiva ou por toda vida (Peixoto, 2002). Na família dos *Tinamidae*, mudanças relacionadas ao comportamento reprodutivo e à idade foram observadas, onde os machos são monógamos quando jovens, mas tornam-se polígamos ao envelhecer (Sick, 1997).

A poligamia refere-se ao comportamento reprodutivo em que um indivíduo tem múltiplos parceiros sexuais na temporada reprodutiva ou ao longo de sua vida, é exibido poliginia, um macho se acasala com mais de uma fêmea e, poliandria, uma fêmea se acasala com mais de um macho (Peixoto, 2002).

A evolução destes sistemas levou ao sistema de acasalamento com maior frequência nas aves, a promiscuidade, sistema onde ocorre mistura entre a poliginia e poliandria (Pough et al., 1999). Nesse caso, tanto machos quanto fêmeas acasalam-se com múltiplos parceiros diferentes. Segundo o descrito em *Tinamidae*, enquanto as fêmeas exibem comportamento poliândrico, os machos podem atrasar a incubação e manter sua atividade sexual, atraindo uma segunda companheira e exibindo comportamento poligínico (Orians, 1969). Estratégias de acasalamento consideradas adaptativas, favorecendo o aumento da eficiência reprodutiva e a variabilidade genética.

### **3.3. Anatomia e histologia reprodutiva masculina das aves**

Poucos estudos abordam detalhes sobre a anatomia macroscópica e microscópica dos órgãos reprodutores da perdiz (*Rhynchotus rufescens*). Sendo assim, os aspectos morfológicos aqui abordados referem-se a diferentes espécies de aves, tanto domésticas quanto silvestres.

O sistema reprodutor das aves é semelhante entre espécies domésticas e silvestres, a diferenciação sexual ocorre durante a fertilização por herança de cromossomas distintos. Dois cromossomos sexuais nas aves, Z e W, formam dois genótipos sexuais com padrão inverso ao observado em mamíferos, o macho com duas cópias do cromossomo Z (ZZ) e as fêmeas com uma cópia de cada cromossomo sexual (ZW) (Teixeira et al., 2012; Grosso et al., 2024). Durante aproximadamente o terceiro e quarto dia embrionário, ocorre o desenvolvimento gonadal e sua diferenciação a partir do sexto e sétimo dia. Nas aves, o sistema reprodutor dos machos é mais simples que dos mamíferos, composto pelos testículos, epidídimo, ductos deferentes e órgão copulador. (McGeady et al., 2006; Sousa, 2007).

Os testículos ocorrem em pares, anatomicamente estão localizados na cavidade abdominal dorsal, paralelos da linha média. Possuem capsula para sua proteção formada por três capas de tecido, túnica serosa externa derivada do peritônio, túnica albugínea formada por tecido conjuntivo e túnica vascular formada por tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos (Samuelson, 2007; Deviche et al., 2021).

Na maioria das espécies de aves, é observada assimetria bilateral, geralmente sendo a gônada esquerda maior do que a direita (Lake et al., 1982). Pesquisa realizada em diferentes linhagens de frangos descreve relação entre assimetria testicular e a idade, indicando que machos jovens possuem testículos esquerdos maiores (Hocking, 1992). No entanto, em aves com reprodução sazonal, o tamanho do testículo é susceptível as mudanças ambientais ao longo do ano, tornando-se maiores no período reprodutivo (Friedmann, 1927; Lake et al., 1982; Paranzini et al., 2018).

Histologicamente as gônadas masculinas das aves são compostas por túbulos seminíferos (TS) e tecido intersticial (INT). No interior dos TS é possível observar células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como células de Sertoli responsáveis pela nutrição e sustentação dessas células. Segundo Froman et al. (2004), em machos imaturos de codornas, os TS são revestidos por única camada de células de Sertoli. No entanto, nos adultos, essas células adotam formato irregular e se alinham ao epitélio germinativo de múltiplas camadas.

Conforme estabelecido por Baraldi et al. (2007), nas perdizes por serem de reprodução sazonal, ocorrem mudanças na estrutura dos TS ao longo do ano, divididas em quatro fases distintas. A fase reprodutiva é caracterizada pelo processo de espermatogênese completo, seguida pela fase de regressão, na qual ocorre a involução do epitélio seminífero; após a fase de repouso, identificada pela presença de espermatogônias e espermatocitos em início de meiose, segue-se a fase de recrudescência, onde se recupera o epitélio seminífero, mas não apresenta espermatozoides. No tecido intersticial são observados vasos sanguíneos e células de Leydig responsáveis pela produção e secreção de hormônios esteroides como a testosterona (Teixeira et al., 2012).

Segundo Pollock et al. (2002) os ductos deferentes são estruturas bilaterais, simétricas, com aspecto tubular, com função de armazenar e transportar os espermatozoides. Localizados ventralmente aos rins, estendendo-se desde a porção caudal dos testículos com direção à cloaca, até o urodeo, onde termina em uma curta papila. De acordo com o estudo realizado por Marvan (1969), o comprimento do ducto deferente em galos varia em função à idade, sendo que os galos jovens apresentam menor comprimento do ducto deferente.

O falo das perdizes é estrutura copuladora análoga ao pênis dos mamíferos. Sua função principal é transportar o sêmen ejaculado pelos ductos deferentes da cloaca do macho até a cloaca da fêmea. No entanto, quando comparado com mamíferos, o falo das aves não tem função no sistema urinário, pois não contém uretra para a excreção da urina. Em vez disso, o ureter ejeta a urina diretamente na cloaca (Sousa, 2007).

#### **3.4. Fisiologia reprodutiva masculina das aves**

O início da maturidade sexual em aves varia de acordo com a espécie e sexo. A maturidade sexual é mais tardia em machos do que em fêmeas (Branson et al., 1994). Os machos da codorna japonesa (*Coturnix coturnix*) e tentilhão-zebra (*Taeniopygia guttata*), atingem maturidade sexual com idade de dois meses. Enquanto, espécies como o galo doméstico (*Gallus gallus*), o periquito (*Melopsittacus undulatus*) e a calopsita (*Nymphicus hollandicus*), sua maturidade sexual é atingida em período mais amplo, aproximadamente entre os seis meses e um ano de idade

(Pollock et al., 2002). Com base nas diferenças encontradas entre espécies de aves silvestres, torna-se relevante determinar a idade em que a perdiz (*Rhynchotus rufescens*) torna-se madura sexualmente com a finalidade de compreender melhor esta espécie.

O sistema reprodutivo de espécies de aves sazonais como a perdiz, é ativado após atingirem o peso e a idade adequados devido aos longos períodos com luz (fotoperíodos), que regulam a dinâmica do ciclo sexual das aves (Pollock et al., 2002). No entanto, quando essas aves são mantidas sob longos períodos de luz após a eclosão, sua maturidade sexual é atrasada devido a tornarem-se foto refratárias, fenômeno em que alguns animais reprodutores sazonais apresentam incapacidade de responder ao fotoperíodo e de se reproduzir no primeiro ano após a eclosão (Tyler et al., 2011).

A foto estimulação permite aumento da produção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo, hormônio responsável por estimular a adenohipófise para produção e secreção de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH). A LH exerce seu efeito diretamente em receptores específicos das células de Leydig, estimulando a produção de testosterona e o subsequente crescimento e desenvolvimento dos testículos (Bruneli et al., 2005). Enquanto a FSH tem papel fundamental nas células germinativas dos TS, atuando no processo da espermatogênese até a fase dos espermatozoides secundários. As etapas finais desse processo são apoiadas pela testosterona produzida pelas células de Leydig (Hafez et al., 2004).

### **3.5. Coleta de sêmen**

Diversas técnicas de coleta de sêmen foram desenvolvidas desde a década de 1930, envolvendo métodos como a massagem dorsoabdominal descrito por Burrow e Quinn (1935) em galos, lavagem cloacal, cloaca artificial, coleta cooperativa utilizando dispositivos de montagem simulada, coleta direta do conduto deferente e eletroestimulação (Paranzini et al., 2018; Frediani et al., 2019).

O uso da eletroestimulação em espécies de aves domésticas foi descrito pela primeira vez em criações comerciais de patos, visando aumentar a contribuição reprodutiva de machos superiores fenotipicamente por meio da inseminação artificial

(Serebrovski et al., 1934). No contexto de espécies de aves silvestres, o primeiro relato sobre eletroestimulação foi documentado em papagaios, conforme registrado por Harrison et al. (1984).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Declaração de ética

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, Brasil. Avaliou e aprovou o presente projeto de pesquisa sob Protocolo n° 083/2020.

### 4.2. Animais

Foram estudados 44 perdizes macho (*Rhynchotus rufescens*), nascidos durante o período reprodutivo de outubro de 2022 a março de 2023, proveniente do criatório de perdizes do Setor de Animais Silvestres, localizado na Fazenda Experimental do Lageado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Unesp, Botucatu, SP.

A alocação dos animais foi conduzida da seguinte maneira: 34 indivíduos distribuídos em 12 grupos etários, cada um com 2 a 4 animais, foram submetidos à eutanásia para coleta dos testículos e posterior análise histológica no intervalo de novembro de 2022 a novembro de 2023. Adicionalmente, 10 animais, com idade entre nove e doze meses foram utilizados para coleta de sêmen e análise espermática em outubro e novembro de 2023 (Figura 1). No entanto, em função do padrão de reprodução sazonal desta espécie, o número de animais utilizado por grupo etário não foi mais amplo.

Todos os animais deste estudo foram obtidos por meio de incubação artificial e alojados inicialmente em boxes de concreto nas primeiras três semanas, com temperatura mantida a 32° Celsius. Posteriormente, foram transferidos para boxes de 6 m<sup>2</sup>, com piso concretado e baias cobertas com cama de feno de gramínea e iluminação natural. O sexo foi determinado por meio da técnica de reversão da cloaca e exposição do falo. Durante todo o período de alojamento, os animais receberam ração a base de milho e farelo de soja e água *ad libitum*. As características do alimento de iniciação oferecido foi (21 % de proteína bruta e 3000 Kcal EM/kg de dieta) e o

alimento de crescimento (18 % de proteína bruta e 2800 Kcal EM/kg de dieta) obtidos de fornecedor comercial.

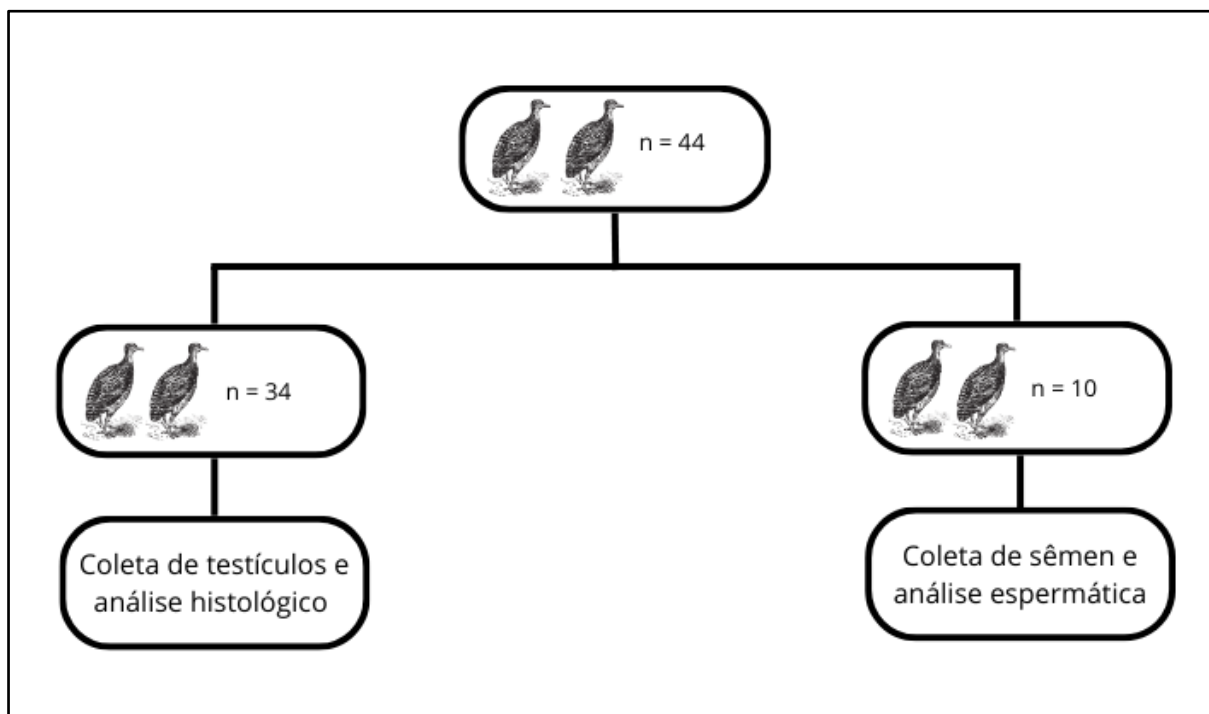


Figura 1. Desenho experimental

#### 4.3. Coleta dos testículos

Os machos foram submetidos à eutanásia por meio da técnica de deslocamento cervical, para a remoção dos testículos, entretanto, anterior ao procedimento foi registrado o peso corporal (PC) de cada animal com o propósito de avaliar o índice gonadossomático (IGS). Este índice foi calculado usando a fórmula descrita por Orlu e Egbunike (2010), a qual consiste na somatória do peso dos testículos, dividido pelo PC, e multiplicado por 100.

Após a coleta dos testículos, foram pesados individualmente por meio de balança analítica com precisão de 0,001g, e mensurado com paquímetro digital, registrando dimensões comprimento e largura. Em seguida foi realizado corte transversal, dividindo cada testículo em duas metades e posteriormente imersos em solução formalina tamponada a 10%. Após da fixação em formalina, as amostras foram desidratadas em etanol com graus de concentrações crescentes (70%, 80%, 95%) durante uma hora em cada grau e embebida em parafina. Os cortes histológicos

foram obtidos com micrótomo rotativo com espessura de 5  $\mu\text{m}$ . Logo, foram corados em eosina e hematoxilina para observações microscópicas.

#### **4.4. Análise de histomorfometria testicular**

As proporções volumétricas do túbulo seminífero (TS), tecido intersticial (INT), o diâmetro do TS e a altura do epitélio seminífero foram determinadas usando o software ImageJ v1.54d (ImageJ, NIH, Bethesda, MD, USA).

##### **4.4.1. Proporção volumétrica de túbulo seminífero e tecido intersticial**

As proporções volumétricas do TS e INT, foram quantificadas utilizando fotografias digitais de 20 campos transversais aleatórios do parênquima testicular de cada animal, com um aumento de 100X. A contagem envolveu 100 pontos de interseção em cada campo, projetados por meio da função Grid do software ImageJ v1.54d, totalizando 2000 pontos por animal, sendo a contabilização dos pontos realizada de acordo com a estrutura na qual incidiam.

Considerando que a densidade volumétrica testicular em aves é bastante próxima de  $1,0 \text{ g/cm}^3$  (Calhim e Birkhead, 2009), determinou-se o volume específico para o compartimento tubular a partir do peso testicular (PT) e a proporção de túbulo seminífero (Vogas, 2010).

##### **4.4.2. Diâmetro tubular e espessura do epitélio seminífero**

O diâmetro médio e a espessura do epitélio dos TS foram determinados pela média das medições realizadas em 20 campos transversais com um aumento de 100X. O formato dos TS mensurados foram o mais circular possível em cada indivíduo.

#### **4.5. Coleta do sêmen**

A metodologia empregada para coleta de sêmen foi adaptada a partir dos estudos conduzidos por Fischer et al. (2014) em ararinhas azuis (*Cyanopsitta spixii*) e por Frediani et al. (2019) em 18 espécies de aves, os quais envolveram a coleta de sêmen por meio de eletroestimulação. No presente estudo, a coleta de sêmen foi realizada três vezes em cada um dos 10 animais durante o período de outubro e

novembro de 2023, período reprodutivo na espécie em questão, com intervalo de 10 dias entre cada coleta, no horário entre as 10:00 e às 16:00 horas.

No procedimento de coleta, as aves não necessitaram de condicionamento prévio. Foram capturados com rede de varredura e imobilizados para o corte das penas da região pericloacal, seguido de limpeza utilizando gaze embebida em solução salina (Frediani et al., 2019). Durante o procedimento, as aves não foram submetidas a sedação ou anestesia, conforme descrito nos estudos realizados por Fischer et al. (2014) e Frediani et al. (2019). A hipótese de que a técnica de massagem seria suficiente para coleta de sêmen foi descartada ao aplicar o método descrito por Paranzini et al. (2018) em perdizes (*Rhynchotus rufescens*). A massagem foi realizada durante dois minutos antes da execução da eletroestimulação, período em que se observa maior probabilidade de ejaculação em aves (Lukaszewicz et al., 2021).

Para a eletroestimulação, utilizou-se uma sonda bipolar com dois eletrodos longitudinais de cobre (Figura 2B). O diâmetro da sonda utilizada foi de 6 mm e 50 mm de comprimento. Após ser desinfetada com etanol 70% e umedecida com solução salina, a sonda foi conectada ao comando do equipamento comercial (Eletrojet®, Eletrovet, São Paulo, Brasil), comando que possibilitou o controle da voltagem dos estímulos elétricos com faixa entre 0 e 12 V (Figura 2A). As aves foram posicionadas fisicamente em decúbito esternal com o objetivo de everter o falo, seguido da introdução da sonda posicionada com os eletrodos dorsalmente (Figura 2C), de forma que os estímulos alcançassem a superfície dorsal cloacal (Frediani et al., 2019).

Foram administradas uma série de estímulos utilizando 1, 2, 3 e 4 V (com três estimulações para cada voltagem), de forma pulsátil com dois segundos de estímulo elétrico seguido de dois segundos de intervalo. Ao concluir a série de estímulos, visando melhor visualização do falo e região cloacal, o animal foi posicionado de cabeça para baixo, entre as pernas do técnico como o descrito por Paranzini et al. (2018). Após esse procedimento, realizou-se leve pressão na cloaca com os dedos polegar e indicador para coletar o sêmen das papilas do ducto deferente (Figura 2D). O sêmen ejaculado foi coletado diretamente da cloaca por meio de tubos capilares de micro hematócrito não heparinizados e pré-aquecidos em placa a 37°C (Figura 2E).

#### 4.1. Análise do sêmen

As amostras de sêmen coletadas foram mantidas a uma temperatura de 37°C até a conclusão de todas as análises. Os parâmetros avaliados incluíram, contaminação (pontuação de 1 a 5), volume ( $\mu\text{l}$ ), motilidade (%), vigor (pontuação de 0 a 5), concentração espermática ( $\times 10^9$  espermatozoide/ml), viabilidade (%) e morfologia espermática (%).

O grau de contaminação da amostra foi avaliado subjetivamente imediatamente após cada coleta, mediante observação direta dos ejaculados puros enquanto estavam ainda em tubos de micro hematócrito, utilizando escala de pontuação de 1 a 5. Foi atribuído a pontuação 1 para indicar aparente ausência de fezes e urina, enquanto a pontuação 5 foi associado a um grau de contaminação aparentemente alta por fezes e urina (Silva, 2020).

O volume de sêmen coletado foi mensurado mediante a marcação na superfície externa dos tubos de micro hematócrito, previamente ajustados utilizando pipeta automática, com precisão de 1 em 1 microlitro ( $\mu\text{l}$ ). Para avaliação da motilidade espermática (porcentagem de espermatozoides com movimento, expressa em escala de 0 a 100%) e vigor espermático (intensidade do movimento, expressa em escala de 0 a 5), as amostras foram diluídas devido à alta concentração do ejaculado em solução salina a 0,9% pré-aquecida (37°C), na proporção de 1 parte de sêmen para 10 do diluidor. Posteriormente foram depositados 5  $\mu\text{l}$  do sêmen diluído entre uma lâmina e lamínula pré-aquecidas (37°C), seguido da análise por meio de microscópio óptico com aumento de 10X e 40X.

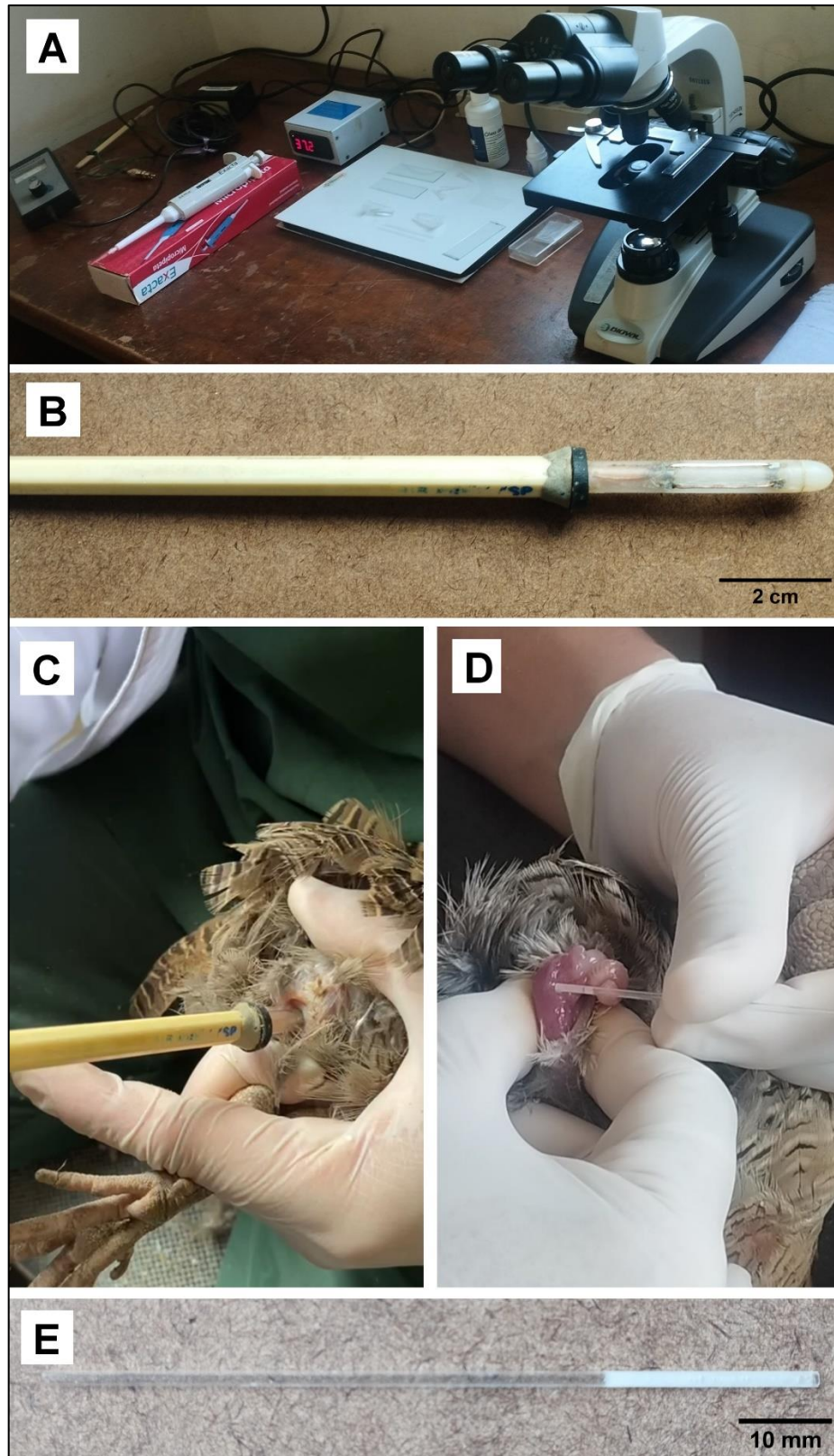


Figura 2. Técnica de coleta de sêmen por meio de eletroestimulação em perdizes (*Rhynchotus rufescens*). (A) preparação da mesa para análise; (B) sonda para eletroestimulação; (C) Inserção da sonda para eletroestimulação; (D) coleta do ejaculado; (E) ejaculado em tubo capilar.

A concentração espermática foi determinada ao diluir 1 µl de sêmen puro em 499 µl de solução salina de formol tamponada (1:500). A partir dessa diluição, os espermatozoides foram contados em câmara de Neubauer. A análise de viabilidade foi realizada por meio de esfregaço obtido da diluição de uma alíquota da amostra de sêmen puro em alíquota de corante contendo eosina-negrosina (BotuVital®, Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil). Foram examinadas 200 células em microscópio óptico com aumento de 1000X e óleo de imersão, sendo classificados em espermatozoides viáveis na ausência de coloração e inviáveis corados de rosa.

A morfologia espermática foi avaliada por meio do esfregaço utilizado para avaliar integridade da membrana plasmática, em microscópio óptico com aumento de 1000X e óleo de imersão. A classificação adotada incluiu, espermatozoides aparentemente normais, bem como defeitos no acrossomo, cabeça, peça intermediária e cauda.

#### **4.2. Análise estatística**

As análises estatísticas dos dados foram realizadas no programa R (R, 2023). As diferenças nas medidas das características entre o testículo esquerdo e direito, bem como dos testículos coletados em estação reprodutiva e em estação não reprodutiva, foram comparadas por meio do teste t. O teste de Shapiro-Wilk e Levene foi realizado para avaliar normalidade da variância e homogeneidade, respectivamente. As alterações na morfometria e histomorfometria dos testículos relacionadas com a idade, foram analisadas por meio de ANOVA unidirecional e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Quando as variâncias não eram homogêneas, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Correlação simples de Pearson foi estimada para características de morfometria e histomorfometria dos testículos. Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão, e considerados significativos quando ( $p < 0,05$ ).

### **5. RESULTADOS**

O PC registrado dos indivíduos avaliados em estação não reprodutiva apresentou aumento ( $p < 0,001$ ) entre o primeiro e quinto mês de idade. A partir do

quinto mês os indivíduos alcançaram PC semelhante com o observado em perdizes macho na fase adulta. Conforme descrito por Tholon et al. (2008) e Correia et al. (2017), animais adultos possuem PC variando entre 600g e 800g, valores semelhantes ao observado no presente estudo. No entanto, no sexto e sétimo mês houve diminuição ( $p < 0,05$ ) do PC. Posteriormente, observou-se aumento ( $p < 0,05$ ) entre o oitavo e nono mês, mantendo-se constante no nono e décimo mês de idade (Figura 3A).

O PC observado em estação não reprodutiva mostrou-se maior ( $p < 0,01$ ) em comparação com o PC registrado em estação reprodutiva para indivíduos com idade de nove e dez meses. Esta observação difere do que foi observado em adultos de galo de angola (*Numida meleagris*) por Abdul-Rahman et al. (2016) e em faisão comum (*Phasianus colchicus*) por Tae et al. (2005), em que o PC na época sem reprodução não apresentou diferenças significativas em relação à época reprodutiva. O PC registrado dos indivíduos avaliados em estação reprodutiva apresentou diminuição ( $p < 0,05$ ) entre o décimo e décimo primeiro mês de idade. Entretanto, não houve diferença significativa entre os indivíduos que nasceram no final da estação reprodutiva e atingiram nove meses de idade na estação reprodutiva seguinte, em comparação com aqueles que nasceram no início da estação reprodutiva e completaram doze meses na estação reprodutiva seguinte.

### **5.1. Morfometria testicular**

Diferentemente da maioria dos mamíferos, os testículos das distintas espécies de aves, incluindo as perdizes, estão localizados na cavidade abdominal, ventralmente à coluna vertebral e aos rins. As diferenças observadas entre o testículo direito e esquerdo, com relação às características de morfometria dos testículos (peso, comprimento e largura do testículo) e histomorfometria (proporção, diâmetro, espessura do epitélio e volume dos TS) não foram significativas. Portanto, para a análise, essas medidas foram consideradas como uma única variável, e não como duas separadas, (testículo esquerdo e direito).

Observou-se aumento ( $p < 0,001$ ) no PT, comprimento e largura dos testículos nos indivíduos avaliados em estação não reprodutiva entre o primeiro e quinto mês de idade. No entanto, houve diminuição ( $p < 0,05$ ) entre o sexto e sétimo mês. No oitavo

mês, tanto o PT quanto o comprimento e a largura testicular não apresentaram diferença significativa em relação ao quinto mês de idade. Isso foi seguido por aumento ( $p < 0,05$ ) entre o nono e décimo mês (Figura 3B, 4A e 4B). Os valores máximos alcançados em estação não reprodutiva foram de 0,20g para o PT, 10,52mm para o comprimento testicular e 5,59mm para a largura testicular.

No décimo mês, momento em que a maturidade sexual foi atingida em estação não reprodutiva no presente estudo, o PT foi superior ao relatado por Abdul-Rahman et al. (2018) em galo de angola (*Numida meleagris*) com 16 semanas de idade, quando a maturidade sexual foi alcançada (0,094g). No entanto, o PT e comprimento testicular dos indivíduos avaliados em estação reprodutiva não apresentou diferenças significativas entre os grupos de idade. Estudos anteriores, relataram maior PT em patos (*Cairina moschata*) e galo doméstico (*Gallus domesticus*) de 2,15g e 6,19g, respectivamente, ao atingirem a maturidade sexual (Gerzilov et al., 2016; Lawson et al., 2022).

O PT, o comprimento e a largura testicular, assim como o IGS, registrados na estação reprodutiva em indivíduos de nove e dez meses de idade, mostraram-se maior ( $p < 0,01$ ) quando comparados com o registrado em estação não reprodutiva para indivíduos com a mesma idade. (Figura 3 e 4).

O IGS calculado apresentou aumento ( $p < 0,001$ ) nos indivíduos avaliados em estação não reprodutiva entre o primeiro e terceiro mês. Posteriormente, o IGS permaneceu relativamente constante entre o terceiro e oitavo mês de idade, com exceção do sexto e sétimo mês, nos quais foi observada diminuição ( $p < 0,05$ ). Além disso, a diferença no IGS do nono e décimo mês em estação não reprodutiva foi maior ( $p < 0,05$ ) em comparação com os meses anteriores.

No décimo mês apresentou-se o maior valor para o IGS em estação não reprodutiva, com 0,05%, correspondendo à maturidade sexual dos indivíduos avaliados. Este valor foi semelhante ao relatado por Gerzilov et al. (2016) em patos (*Cairina moschata*) com cinco meses de idade em que foi atingida a maturidade sexual (0,05%). Na estação reprodutiva, o IGS calculado não apresentou diferenças significativas entre os grupos de idade (Figura 3C). Esses resultados foram superiores aos obtidos em estudos anteriores, que relataram IGS de 0,37% para galo doméstico ao atingirem a maturidade sexual (Lawson et al., 2022).

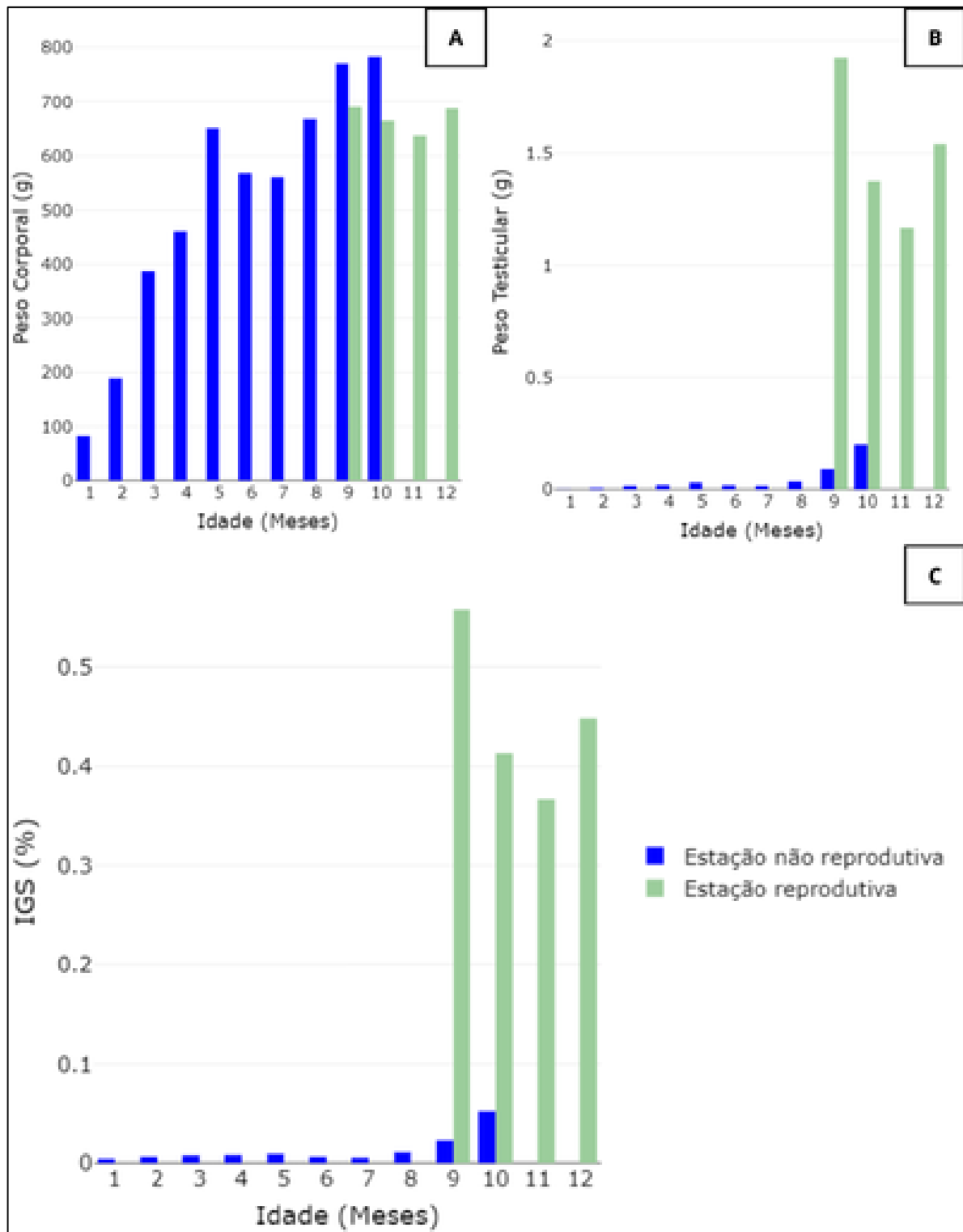


Figura 3. Evolução do peso corporal, peso testicular e índice gonadossomático em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) durante o crescimento. (A) peso corporal; (B) peso testicular médio; (C) índice gonadossomático. Diferenças significativas em estação não reprodutiva são indicadas por diferentes letras minúsculas ( $p < 0,05$ ). Diferenças significativas em estação reprodutiva são indicadas por diferentes letras maiúsculas ( $p < 0,05$ ).

Diferença estatisticamente significativa: \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; teste t.

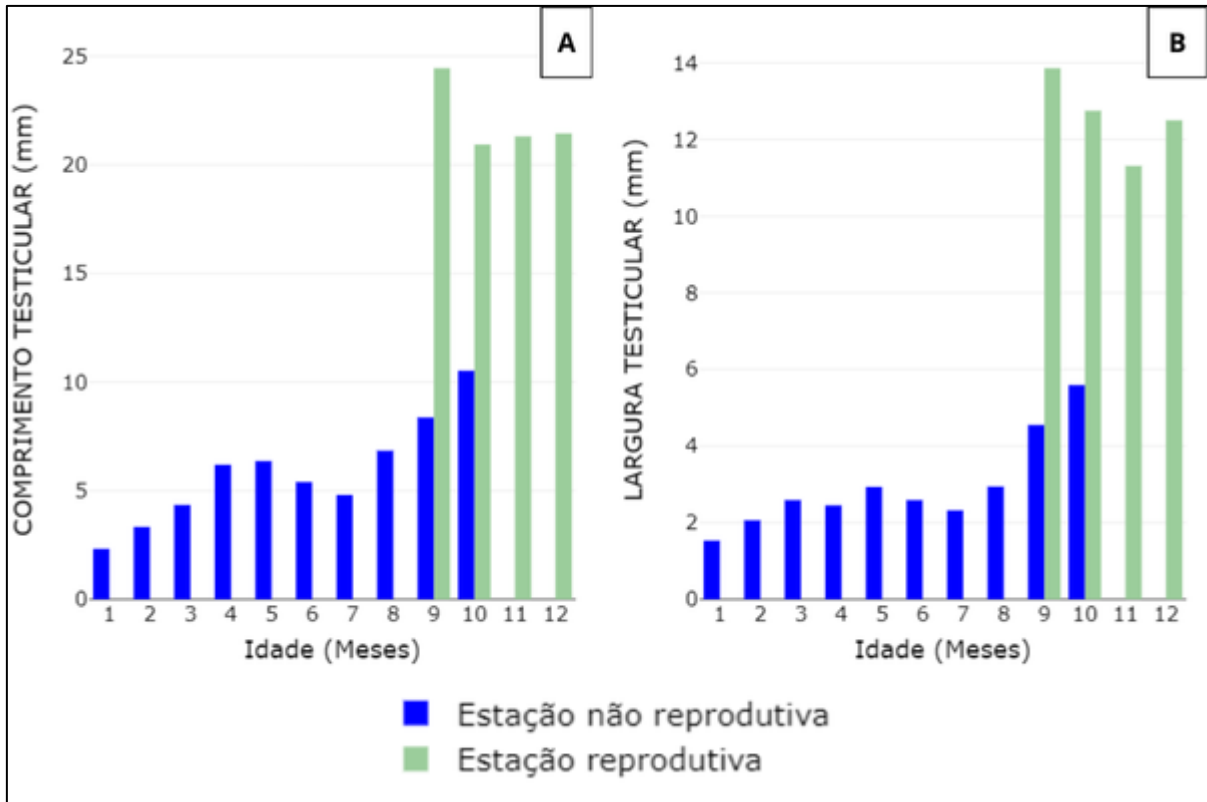


Figura 4. Evolução do comprimento e largura testicular em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) durante o crescimento. (A) comprimento testicular; (B) largura testicular. Diferenças significativas em estação não reprodutiva são indicadas por diferentes letras minúsculas ( $p < 0,05$ ). Diferenças significativas em estação reprodutiva são indicadas por diferentes letras maiúsculas ( $p < 0,05$ ).

Diferença estatisticamente significativa: \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; teste t.

## 5.2. Histomorfometria testicular

Durante o primeiro e sétimo mês de idade observou-se células de Sertoli e espermatogônias, próximas à membrana interna dos TS, de forma ordenada em uma única camada (Figura 2A). A partir do oitavo e nono mês foi observado aumento na prevalência de espermatogônias e células de Sertoli, estas últimas caracterizadas por um citoplasma claro e núcleo escuro (Figura 7). A diferenciação celular característica da espermatogênese foi evidente a partir do décimo mês de idade em estação não reprodutiva, momento em que foram observados espermátides e espermatozoides histologicamente pela primeira vez nos TS, indicando o início da atividade sexual (Figura 7).

Observações semelhantes foram descritas por Sousa (2007) em emas (*Rhea americana americana*), com dez meses de idade. No entanto, a diferenciação celular

e presença de espermatozoides observada nos machos com nove meses de idade em estação reprodutiva no presente estudo, sugere que os filhotes nascidos no final da estação reprodutiva atingem a maturidade sexual mais precocemente do que os nascidos no início da estação reprodutiva.

Nos testículos dos machos com um mês de idade, observou-se maior área coberta por tecido intertubular em comparação com o compartimento tubular. Aumentos ( $p < 0,001$ ) foram registrados na proporção e volume dos TS dos machos analisados em estação não reprodutiva entre o primeiro e quinto mês de idade. No entanto, diminuíram ( $p < 0,05$ ) no sexto e sétimo mês de idade. Adicionalmente, tanto na proporção tubular quanto no volume tubular foram observados aumentos ( $p < 0,05$ ) entre o oitavo e décimo mês de idade.

No décimo mês, quando atingida a maturidade sexual, a proporção e o volume tubular foram de  $77,16 \pm 3,42\%$  e  $0,31 \text{ cm}^3$ , respectivamente (Figura 5A e 5D). Este valor foi semelhante ao relatado em codorna japonesa aos 30 dias, quando foram observados espermatozoides no lúmen tubular pela primeira vez (Lanna, 2012) e ao relatado por Tae et al. (2005) em faisões adultos em estação não reprodutiva.

Os indivíduos avaliados em estação reprodutiva, apresentaram diminuição ( $p < 0,001$ ) tanto na proporção tubular quanto no volume tubular entre o décimo e décimo primeiro mês de idade em relação ao nono mês. No décimo segundo mês, observou-se aumento ( $p < 0,05$ ) em comparação ao décimo primeiro mês. No entanto, esse aumento não foi significativo quando comparado ao décimo mês. Contudo, no nono mês de idade em estação reprodutiva, foram observados os maiores valores para a proporção tubular ( $84,82 \pm 2,96\%$ ) e o volume tubular ( $3,26 \pm 0,11 \text{ cm}^3$ ). Esses valores são semelhantes aos descritos por Noirault et al. (2006) em perus adultos (*Meleagris gallopavo*) e Tae et al. (2005) em faisões (*Phasianus colchicus*) adultos em estação reprodutiva. Entretanto, maiores valores na proporção tubular foram descritos em aves adultas de outras ordens, como codorna japonesa (Lanna, 2012), reprodutores da linhagem Cobb (Carvalho, 2016), reprodutores de raça local nigeriana (Chidozie et al., 2010) e periquitos australianos (Vogas, 2010).

A proporção, diâmetro, volume tubular e a espessura do epitélio dos TS, registrados em estação reprodutiva de indivíduos com nove e dez meses de idade,

mostraram-se maiores ( $p < 0,01$ ) quando comparados com o registrado em estação não reprodutiva para indivíduos com a mesma idade.

Entre o primeiro e quinto mês de idade, foram observados incrementos ( $p < 0,001$ ) tanto nos diâmetros dos TS quanto na espessura do epitélio seminífero (Figura 5B e 5C). Com exceção do quarto mês, em que a diminuição foi significativa com relação ao terceiro mês. No sexto e sétimo mês apresentaram diminuição ( $p < 0,05$ ) em comparação ao quinto mês. Tanto o diâmetro tubular quanto a espessura do epitélio seminífero no oitavo mês de idade não apresentaram diferença significativa em comparação ao quinto mês.

No décimo mês, as duas características apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao oitavo e nono mês de idade. Os valores observados no décimo mês foram menores aos diâmetros tubulares e a espessura do epitélio seminífero relatados por Baraldi-Artoni et al. (2007) em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) adultas em estação não reprodutiva, e maiores ao reportado por Gerzilov et al. (2016) e Lanna (2012) para patos (*Cairina moschata*) e codorna japonesa quando atingida a maturidade sexual.

O diâmetro tubular dos indivíduos avaliados em estação reprodutiva apresentou diminuição ( $p < 0,001$ ), entre o décimo e o décimo primeiro mês de idade. No entanto, o décimo segundo mês não apresentou diferença significativa em relação ao nono mês de idade. Quanto à espessura do epitélio seminífero em animais avaliados em estação reprodutiva, foi observada diminuição ( $p < 0,001$ ) no décimo primeiro mês de idade em relação aos meses anteriores (nono e décimo). Seguida de aumento ( $p < 0,05$ ) no décimo segundo mês de idade, em que apresentou o maior valor registrado em estação reprodutiva.

Valores semelhantes de diâmetro tubular foram relatados por Baraldi-Artoni et al. (2007) em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) e por Abdul-Rahman et al. (2016) em galo de angola (*Numida meleagris*) adultos em estação reprodutiva. Valores menores tanto para o diâmetro tubular quanto para a espessura do epitélio seminífero em adultos foram descritos em peru, codorna japonesa, faisão comum e galo doméstico (Noirault et al., 2006; Santos, 2012; Castillo, 2012; Carvalho, 2016).

No presente estudo, observou-se correlação forte e positiva entre o PC e a proporção tubular. Além disso, as correlações entre o PC e as variáveis comprimento testicular, largura testicular, diâmetro tubular e espessura do epitélio seminífero foram

positivas, moderadas e significativas. Quanto as correlações entre as características de morfometria e histomorfometria dos testículos foram todas altamente significativas (Tabela 1). Resultados semelhantes foram descritos por Abdul-Rahman et al. (2016) e Ahmed et al. (2022) para características morfológicas dos testículos em galo de angola (*Numida meleagris*).

Tabela 1. Correlações entre peso corporal, parâmetros de morfometria e histomorfometria dos testículos da perdiz *Rhynchotus rufescens* durante o crescimento.

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1. Peso corporal</b>	1							
<b>2. Peso testicular</b>	0,32	1						
<b>3. Comprimento testicular</b>	0,46*	0,97***	1					
<b>4. Largura testicular</b>	0,41*	0,98***	0,98***	1				
<b>5. Índice gonadossomático (IGS)</b>	0,30	0,99***	0,97***	0,97***	1			
<b>6. Proporção túbulo seminífero</b>	0,75***	0,70***	0,80***	0,78***	0,70***	1		
<b>7. Diâmetro túbulo seminífero</b>	0,40*	0,97***	0,98***	0,99***	0,97***	0,79***	1	
<b>8. Espessura epitélio seminífero</b>	0,44*	0,95***	0,97***	0,99***	0,95***	0,82***	0,99***	1
<b>9. Volume túbulo seminífero</b>	0,31	0,99***	0,96***	0,97***	0,99***	0,70***	0,97***	0,94***

N = 30

\* Correlação é significativa em  $p < 0,05$ ; \*\* Correlação é significativa em  $p < 0,01$ ; \*\*\* Correlação é significativa em  $p < 0,001$

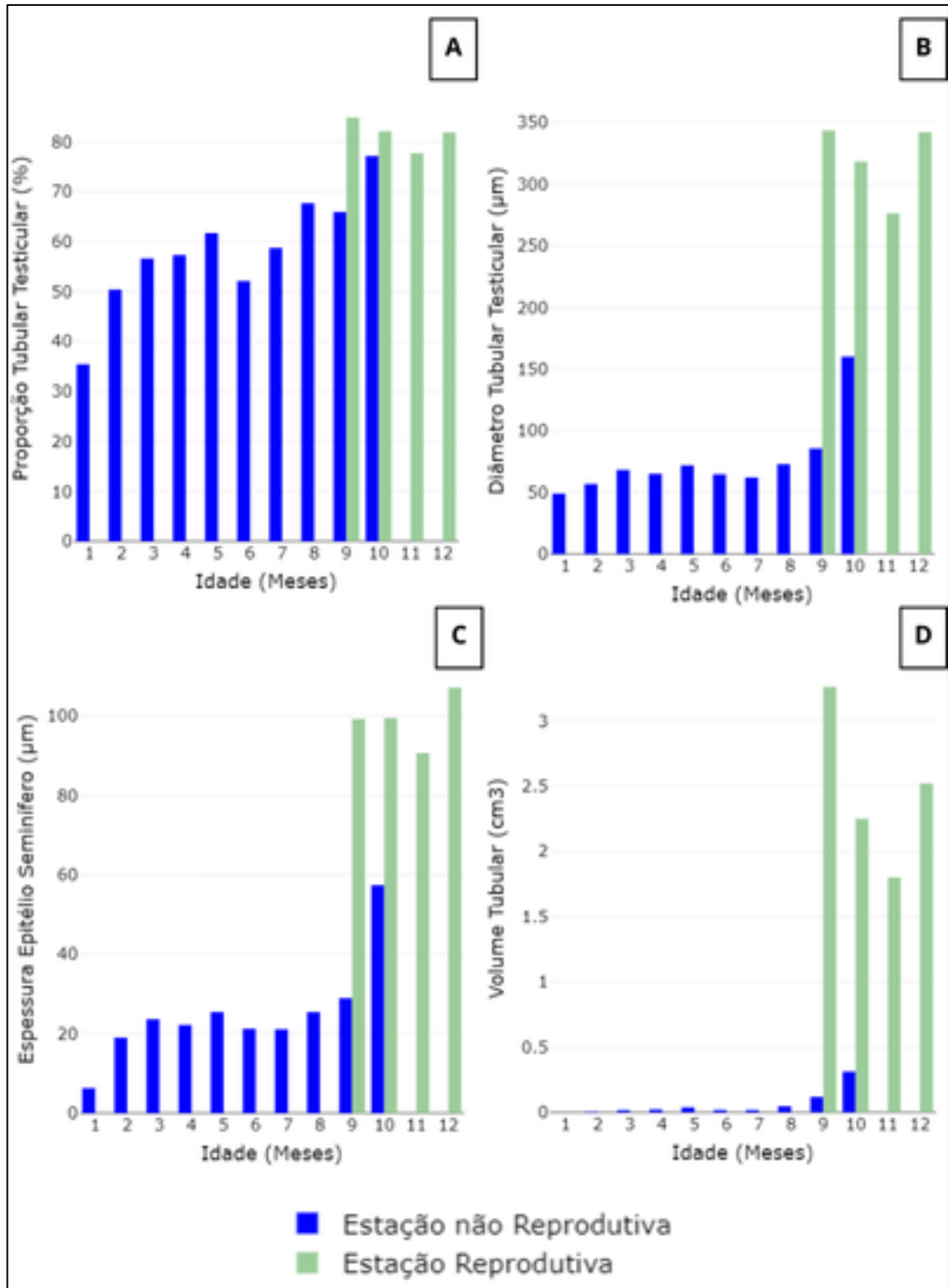


Figura 5. Variação histomorfológica dos testículos de perdores (*Rhynchotus rufescens*) durante o crescimento. (A) proporção tubular; (B) diâmetro tubular; (C) espessura epitélio seminífero; (D) volume tubular. Diferenças significativas em estação não reprodutiva são indicadas por diferentes letras minúsculas ( $p < 0,05$ ). Diferenças significativas em estação reprodutiva são indicadas por diferentes letras maiúsculas ( $p < 0,05$ ).

Diferença estatisticamente significativa: \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; teste t.

### 5.3. Coleta do sêmen

A metodologia de coleta de sêmen com eletroestimulação, adaptada a partir dos estudos realizados por Fischer et al. (2014) e Frediani et al. (2019), demonstrou eficácia em perdizes *Rhynchotus rufescens* de nove a doze meses de idade durante a estação reprodutiva. Foram necessárias 40 tentativas de coleta de sêmen em 10 aves utilizando eletroestimulação para avaliar 3 amostras por animal. A taxa de sucesso na coleta por eletroestimulação alcançou 75%. Este valor supera os resultados obtidos por Paranzini et al. (2018) em perdizes *Rhynchotus rufescens* (63%) e por Dogliero et al. (2016) em papagaios *Nestor notabilis* (58,8%) utilizando massagem dorsoabdominal durante a estação reprodutiva. No entanto, em estudos anteriores foram observados menores valores de eficácia na coleta de sêmen por meio de eletroestimulação em diferentes espécies de aves. Lierz et al. (2013) registraram eficácia na coleta de 66,9% em 151 espécies de psitacídeos, Fischer et al. (2014) relatou 44,3% em ararinhas azuis e Frediani (2016) obteve 54% em patos coscoroba, 31% em Urubu rei e 22% em gavião pega macaco. Contudo, maiores taxas de sucesso na coleta com eletroestimulação também foram relatadas por Lierz et al. (2013) em cacatuas, com 93,6% e Schneider et al. (2019) em perdiz de cauda afiada (*Tympanuchus phasianellus columbianus*), com 100%.

Durante o estudo, apenas uma tentativa de coleta (2,5%) foi associada à manipulação pré-estimulação que incluiu a massagem dorso-abdominal, e a proximidade da fêmea não atuou como fator estimulante. Nenhum dos animais utilizados para a coleta de sêmen veio a óbito durante o período de estudo.

### 5.4. Análise do sêmen

Das amostras analisadas, nenhuma foi classificada como grau 5, uma vez que não apresentaram grau alto de contaminação por fezes e urina. Apenas 6 (20%) foram classificadas como grau 4, 10 (33,3%) como grau 3, 11 (36,6%) como grau 2 e 3 (10%) como grau 1.

No presente estudo, o volume de sêmen coletado oscilou entre 8  $\mu$ l e 32  $\mu$ l, com média de  $14,94 \pm 5,96$   $\mu$ l (Tabela 2). Este valor foi semelhante ao descrito por Cavalcante (2006) em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) com idade entre um e dois anos de idade ( $14,13 \pm 2,33$   $\mu$ l) coletados com estimulação manual em estação

reprodutiva. Góes et al. (2011) reportaram maiores valores para volume do ejaculado em perdizes de três e quatro anos de idade em estação reprodutiva ( $24,66 \pm 2,58 \mu\text{l}$ ), Paranzini et al. (2018) registraram  $58,4 \pm 44,5 \mu\text{l}$  em estação reprodutiva para indivíduos com cinco e oito anos e Correia (2017) relatou  $64,8 \pm 44,9 \mu\text{l}$  em indivíduos entre seis e oito anos.

Maior volume do ejaculado também foi relatado por Brien et al. (2023) em perdiz vermelha (*Alectoris rufa*), com idade entre três e quatro anos de idade ( $22,52 \pm 3,97 \mu\text{l}$ ). Entretanto, volumes variáveis foram descritos em diferentes espécies quando coletados por meio da técnica de eletroestimulação. Frediani (2016) reportou valores médios de  $11,55 \mu\text{l}$  em jacutinga,  $4,98 \mu\text{l}$  em gavião real e  $118,21 \mu\text{l}$  em pato coscoroba, Schneider et al. (2019) registraram volume de  $17,7 \pm 12,4 \mu\text{l}$  em perdiz de caudaafiada.

A motilidade espermática foi semelhante aos valores reportados por Cavalcante (2006) para perdizes entre um e dois anos de idade (66%). Entretanto, ligeiramente inferior aos valores relatados para perdizes maiores a três anos de idade, variando entre  $71,2 \pm 11,8\%$  e  $77,16 \pm 2,02\%$  (Góes et al., 2011; Paranzini et al., 2018; Correia, 2017).

Menores valores para motilidade espermática foram relatados por Schneider et al. (2019) em perdiz de caudaafiada ( $33,2 \pm 24\%$ ), e por Frediani (2016) em cisne do pescoço preto ( $20 \pm 20\%$ ), pato coscoroba ( $24,62 \pm 7,13$ ) e araçari banana ( $45 \pm 15\%$ ). Com relação ao vigor espermático observou-se similaridade em relação a idades mais avançadas descritas na literatura em perdizes da mesma espécie

A concentração espermática média obtida neste estudo (Tabela 2), foi superior ao relatado por Cavalcante (2006) para perdizes entre um e dois anos de idade ( $0,93 \pm 0,14 \times 10^9$  espermatozoides/ml). Concentrações espermáticas semelhantes foram descritas por Paranzini et al. (2018) e Correia (2017) em perdizes com idade entre cinco e oito anos, com valores de  $1,62 \pm 0,73 \times 10^9$  espermatozoides/ml e  $1,6 \pm 0,8 \times 10^9$  espermatozoide/ml, respectivamente. Ao comparar com outras espécies de aves, as perdizes avaliadas apresentaram valores de concentração espermática superiores aos relatados para adultos em urubu rei, suindara, gavião real, galo selvagem vermelho indiana e perdiz de caudaafiada. (Frediani, 2016; Rakha et al., 2017; Schneider et al., 2019).

A viabilidade, apresentou taxa semelhante do reportado por Cavalcante (2006) em perdizes com dois anos de idade (82%). Entretanto, maior do descrito por Góes et al. (2011) em perdizes entre dois e quatro anos de idade (67,17%). Os resultados de viabilidade espermática deste estudo (Tabela 2 e Figura 6), quando comparados com idades maiores descritas na literatura para a mesma espécie, diferem do relatado por Schneider et al., 2019 para perdiz de cauda afiada (*Tympanuchus phasianellus columbianus*), em que menores valores foram apresentados em animais jovens em comparação aos adultos.

A avaliação da morfologia espermática revelou média de 45,91% de defeitos totais observados nos indivíduos analisados. Dentro desses resultados, os defeitos mais comuns foram: Acrossomo intumescido, macrocefalia, peça intermediária dobrada e intumescida, cauda dobrada e enrolada (Tabela 3 e Figura 7). A média dos defeitos totais observados, foi semelhante com o observado por Cavalcante (2006) em perdizes com dois anos de idade. No entanto, menor do descrito para perdizes por Góes et al. (2011) entre três e quatro anos (58,56%) e Paranzini et al. (2018) entre cinco e oito anos (70%).

Tabela 2. Análise espermático de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) de 9 a 12 meses de idade, coletados por meio de eletroestimulação na estação reprodutiva

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± desvio padrão</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
Volume (µl)	14,94 ± 5,96	8,0	32,0
Motilidade espermática (%)	65,97 ± 15,67	30,0	90,0
Vigor espermático (0-5)	3,45 ± 0,89	2,0	5,0
Concentração (x10 <sup>9</sup> espermatozoides/ml)	1,49 ± 0,66	0,4	3,3
Viabilidade espermática (%)	85,96 ± 6,48	70,5	96,4

Tabela 3. Avaliação da morfologia espermática de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) de 9 a 12 meses de idade, coletados por meio de eletroestimulação na estação reprodutiva

	Variáveis (%)	Média ± desvio padrão
	Normais	54,11 ± 15,87
<b>Acrossomo</b> 8,57%	Intumescido	3,70 ± 2,70
	Destacado	0,24 ± 0,39
<b>Cabeça</b> 24,63%	Macrocefalia	7,33 ± 3,59
	Microcefalia	1,10 ± 1,17
	Dobrada	2,09 ± 3,52
	Destacada	0,80 ± 1,08
<b>Peça intermediária</b> 17,37%	Intumescida	2,06 ± 3,08
	Dobrada	5,76 ± 3,22
	Destacada	0,15 ± 0,61
	Gota proximal	0,82 ± 1,59
<b>Cauda</b> 43,37%	Dobrada	9,20 ± 4,63
	Destacada	2,24 ± 2,09
	Enrolada	7,25 ± 4,95
	Gota distal	0,41 ± 0,76
<b>Outros - 6,04%</b>	Teratológicos	2,77 ± 5,32
	Defeitos totais	45,91 ± 15,89

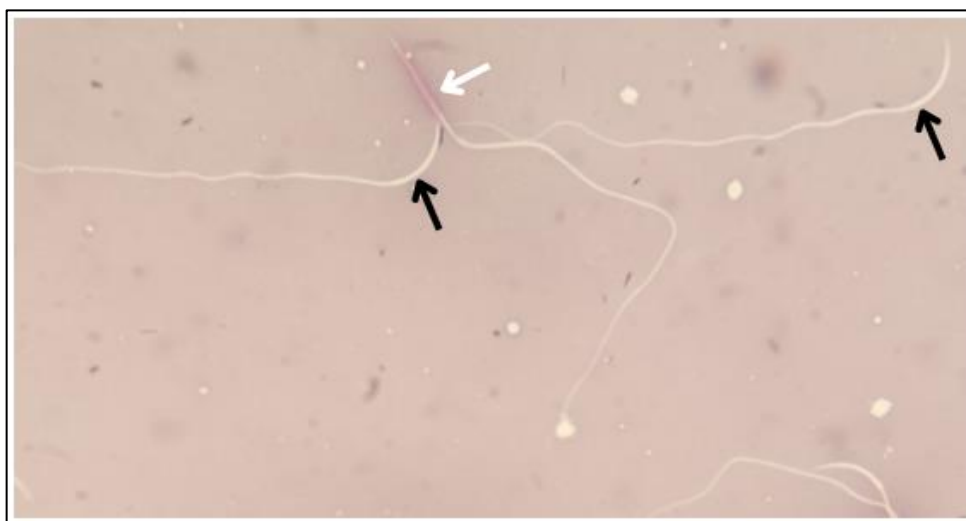


Figura 6. Teste de coloração supravital em espermatozoides de perdizes (*Rhynchotus rufescens*). 1000X. (Setas pretas) espermatozoides viáveis. (Seta branca) espermatozoide inviável.

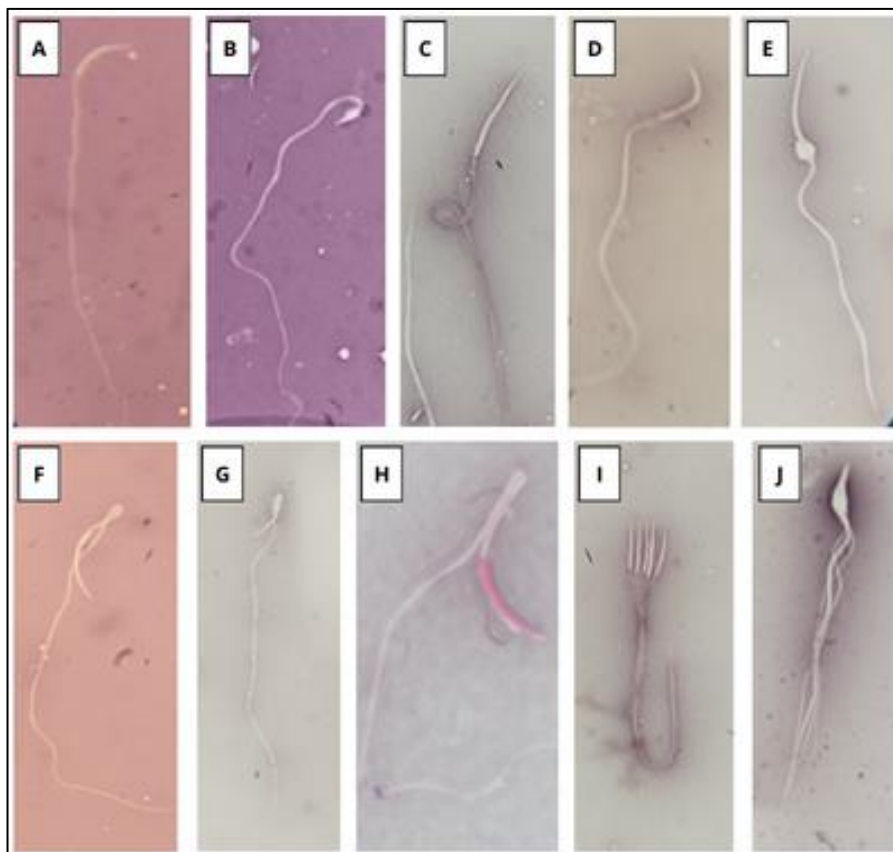


Figura 7. Defeitos morfológicos de espermatozoides de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) entre 9 e 12 meses de idade em estação reprodutiva. 1000X. (A) espermatozoide normal; (B) microcefalia; (C) macrocefalia; (D) cabeça dobrada; (E) peça intermediária intumescida; (F) cauda enrolada; (G) peça intermediária dobrada; (H) cauda dobrada; (I-J) teratológicos.

## 6. DISCUSSÃO

A seleção de indivíduos aptos para reprodução é fundamental tanto para programas de conservação quanto para criatórios comerciais. Neste estudo, foi determinada a idade da maturidade sexual em machos e relatada pela primeira vez a qualidade espermática em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) com menos de um ano de idade, obtida por meio de eletroestimulação.

O PC, conforme evidenciado neste estudo, assim como em outras espécies de aves, não pode ser o único critério considerado na seleção de indivíduos com fins de reprodução. Isso devido a que o PC não é o único determinante da maturidade sexual (Williams, 2018; Klein et al. 2018). O fotoperíodo de criação desempenha papel crucial tanto para a dissipação do estado fotorefratário quanto na determinação da idade da maturidade sexual das aves (Lewis, 2006). Por sua vez, a maturidade sexual pode ser

determinante do PC máximo, uma vez que o gasto energético é maior em fotoperíodos longos e no comportamento reprodutivo (Lewis, 2006). Estudo em Abetarda-comum (*Otis tarda*), relataram aumento do PC até os cinco anos, período de imaturidade sexual (Alonso et al., 2010). Resultados semelhantes foram observados por Santos et al. (2012) em codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) e cordona européia (*Coturnix coturnix coturnix*), em que o PC não apresentou aumentos significativos entre os 60 (maturidade sexual) e 360 dias de idade.

Diferentes variações foram relatadas para características morfológicas entre os testículos direito e esquerdo em diversas espécies de aves (Friedmann, 1927; Lawson et al., 2022). Porém, não existe padrão definitivo. No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas nas características analisadas entre os testículos direito e esquerdo. Resultados semelhantes aos descritos por Olea et al. (2018) em *Columba livia* e Lawson et al. (2022) em *Gallus domesticus* durante o desenvolvimento.

O solstício de inverno no hemisfério sul ocorre em junho, caracterizado por ser o dia mais curto do ano, influência nas características dos testículos em aves sensíveis aos estímulos lumínicos (Campos, 2000). Esse fenômeno pode explicar os valores obtidos nas características de morfometria e histomorfometria dos testículos entre o sexto e sétimo mês de idade, uma vez que a data da coleta dos testículos foi entre maio e junho. De forma semelhante foi observado por Madekurozwa et al. (2002), em avestruzes imaturas, com diâmetro tubular e espessura do epitélio seminífero menores durante os meses de maio e junho, o que foi relacionado pelos autores com o curto fotoperíodo.

Pelo contrário, o fotoperíodo prolongado durante a primavera, desencadeia o mecanismo neuro-hormonal por meio da luz percebida pelos fotorreceptores, que ativa o hipotálamo, e aumenta a secreção do GnRH, controlando a secreção de gonadotrofinas pela hipófise. Isso, por sua vez, estimula o desenvolvimento dos testículos e a maturidade sexual (Bruneli et al., 2005). Essa observação explica o maior desenvolvimento observado em características de morfometria e histomorfometria testicular, bem como o alcance da maturidade sexual mais precoce nos indivíduos avaliados em estação reprodutiva.

Os parâmetros de morfometria e histomorfometria dos testículos coletados em estação não reprodutiva, não apresentaram estabilidade antes de atingir a maturidade sexual. Isso ocorre possivelmente porque a maturidade sexual dessas aves coincidiu com a época não reprodutiva e, portanto, maiores aumentos são esperados durante a estação reprodutiva.

Diferentemente do observado em estação não reprodutiva, os parâmetros de morfometria dos testículos e o IGS dos animais avaliados em estação reprodutiva, foram estáveis a partir do nono mês de idade. Esse achado indica que animais que nasceram em fevereiro e março e atingiram nove e dez meses em estação reprodutiva subsequente apresentam parâmetros morfométricos dos testículos semelhantes aos obtidos nos animais nascidos em outubro e novembro que atingiram onze e doze meses na estação reprodutiva seguinte.

Esse padrão pode ser explicado pela dissipação da refratariedade com curtos fotoperíodos de criação, o que permite responder ao estímulo lumínico com menor idade (Lewis, 2006). A estabilização das características de morfometria dos testículos foi observada com menor idade em galo da espécie angola (*Numida meleagris*) e em patos (*Cairina moschata*) com cinco e oito meses, respectivamente (Gerzilov et al., 2016; Abdul-Rahman et al., 2018).

O maior desenvolvimento dos túbulos seminíferos em animais fotoestimulados com nove meses de idade em comparação com o décimo e décimo primeiro mês em estação reprodutiva, é possivelmente devido a maior fotosensibilidade. Resultados semelhantes foram descritos por Lawson et al. (2022) em que maiores valores para características testiculares em *Gallus domesticus* foram observados no terceiro mês, quando a maturidade sexual foi alcançada, em comparação com o quarto mês de idade. Estudo em galos da linhagem White Leghorn e Beijing You Chicken, reportou maiores valores de características testiculares em animais fotoestimulados na semana 16 em comparação com machos fotoestimulados na semana 22 (Shi et al., 2021). Portanto, machos fotoestimulados precocemente, apresentam maior fotosensibilidade, atingindo a maturidade sexual mais cedo (Santos et al., 2012).

Com base na literatura revisada, parâmetros de morfometria testicular não foram reportados em perdizes (*Rhynchotus rufescens*), impossibilitando a comparação dos resultados obtidos neste estudo durante a maturidade sexual com

outros estudos na espécie em questão. Entretanto, quando comparados com espécies de aves como patos (*Cairina moschata*), galo de angola (*Numida meleagris*) e galo doméstico (*Gallus domesticus*), os resultados dos parâmetros morfométricos e do IGS mostraram-se consistentes e em conformidade com a variação normal observada quando alcançada a maturidade sexual nas diferentes espécies de aves. (Gerzilov et al., 2016; Abdul-Rahman et al., 2018; Lawson et al., 2022).

Os resultados deste estudo, revelaram que indivíduos avaliados em estação reprodutiva, exibiram semelhanças em características histológicas com o descrito por Baraldi-Artoni et al. (2007) em adultos da mesma espécie em estação reprodutiva. Essa observação indica que os indivíduos que atingem a maturidade sexual a partir dos nove meses em estação reprodutiva, apresentam condições para a reprodução. Por outro lado, os animais com dez meses de idade em estação não reprodutiva, apesar de terem alcançado a maturidade sexual, necessitam da fotoestimulação para um maior desenvolvimento testicular.

A eficácia da coleta por meio de massagem manual realizado previamente à eletroestimulação em perdizes de nove a doze meses de idade, mostrou-se inferior em comparação ao relatado por Paranzini et al. (2018) em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) adultas. Sugerindo menor resposta à técnica nessa fase inicial da vida reprodutiva. No entanto, a eletroestimulação foi uma alternativa viável, não exigindo aves condicionadas ou treinadas, mesmo após iniciada a maturidade sexual. Apesar da eficácia demonstrada no presente estudo na obtenção do sêmen por meio de eletroestimulação, é importante considerar que as tentativas foram realizadas apenas durante a estação reprodutiva. Porém, pesquisas explorando a aplicação dessa técnica em estação não reprodutiva e em aves adultas são necessárias para melhor compreensão de sua eficácia.

Um fator que contribui ao abandono do uso da eletroestimulação em aves, é a elevada contaminação das amostras por fezes (Frediani, 2016). A reação das aves sob pressão depredatória é a defecação, pois isso as torna mais leves e aumenta a possibilidade de escapar (Tillmann, 2009). A manifestação desse comportamento pode se tornar evidente na manipulação do técnico durante a eletroestimulação. No entanto, além da resposta fisiológica, a inserção inadequada da sonda para a estimulação pode ser outra causa. Conforme observado por Lierz et al. (2016) é

necessário garantir que a sonda seja inserida no urodeo para reduzir o risco de obter amostras contaminadas. No presente estudo, não foram registradas amostras descartadas por elevada contaminação, possivelmente devido à aplicação adequada e resposta favorável das perdizes à técnica.

Diferenças na qualidade do sêmen foram descritas em relação ao método de coleta em mamíferos, considerando o uso da vagina artificial, a massagem manual e a eletroestimulação (Leon et al., 1991; Marco-Jiménez et al., 2005; Giuliano et al., 2008). Essas variações foram atribuídas principalmente à composição do fluido seminal secretado pelas glândulas sexuais acessórias. No entanto, em aves, a origem do líquido seminal é diretamente das células de Sertoli, o epidídimo e pregas linfáticas da cloaca (Moraes, 2004).

De acordo com Kanatiyanont et al. (2012) diferenças na qualidade do sêmen com relação à técnica de coleta (massagem manual e eletroestimulação) não foram observadas em Galo lutador siamês (*Gallus gallus*). Não se sabe se alterações na qualidade do sêmen podem ser influenciadas pela eletroestimulação em perdizes. Entretanto, neste estudo, os resultados obtidos na análise espermática, foram semelhantes aos descritos por Cavalcante (2006) em perdizes entre um e dois anos de idade por meio de massagem manual.

A qualidade do sêmen é influenciada por fatores individuais, nutricionais e ambientais. Parâmetros como o volume do ejaculado, concentração e viabilidade espermática são componentes fundamentais na avaliação do sêmen em programas de reprodução com fins comerciais ou de conservação. O volume de sêmen e viabilidade espermática nas perdizes avaliadas, demonstrou semelhança com estudos realizados em indivíduos da mesma espécie entre um e dois anos de idade, porém não com machos com mais de três anos. Entretanto, apesar do menor volume ejaculado, a concentração espermática mostrou-se similar quando comparada com estudos realizados em perdizes de maior idade (Góes et al., 2011; Paranzini et al., 2018). Isso sugere que o volume ejaculado provavelmente aumenta com a idade em perdizes.

Assim como observado por Rakha et al. (2017) em galo selvagem vermelho indiana (*Gallus gallus murghi*) e por Schneider et al. (2019) em perdiz de cauda afiada, associado com maior adaptação da espécie ao ambiente. Este padrão contrasta com

o observado em mamíferos, em que o volume ejaculado diminui com a idade, associado à disfunção das glândulas acessórias (Abah et al., 2023), e em aves domésticas, relacionado com mau funcionamento dos testículos e deposição de gordura nos túbulos seminíferos (Jiménez, 2013; Shaheen, 2023).

A viabilidade espermática é frequentemente associada à integridade da membrana plasmática. Em animais jovens, a alta concentração de fosfolípidos e colesterol na membrana plasmática resulta em uma membrana de alta qualidade (Trevisan, 2013). Além disso, a alta viabilidade espermática pode ser influenciada pela elevada concentração de antioxidantes no plasma seminal, que protegem as membranas espermáticas da peroxidação lipídica (Góes et al., 2011).

Entre os fatores essenciais para a fertilização, destacam-se a motilidade e vigor espermática (Bonato et al. 2012). Neste estudo, foi constatado que perdizes menores de um ano apresentam características de motilidade levemente inferiores ao reportado em perdizes maiores de três anos de idade. No entanto, esse achado pode estar relacionado à elevada taxa de defeitos na peça intermediária e na cauda observada neste estudo. Defeitos na morfologia tanto da peça intermediária quanto da cauda estão relacionados à baixa motilidade dos espermatozoides, uma vez que o trifosfato de adenosina (ATP), necessário para o deslocamento dos espermatozoides, é produzido nas mitocôndrias da peça intermediária (Froman e Feltmann, 1998).

A avaliação da morfologia é fundamental para determinar a porcentagem de espermatozoides normais com capacidade de fertilização (Schneider et al., 2019). Defeitos na morfologia estão fortemente associados tanto à espermatogênese defeituosa por imaturidade sexual quanto à degeneração testicular e epididimária causada por fatores como altas temperaturas e o avanço da idade dos animais (Mandal et al., 2009).

A média de defeitos totais obtida neste estudo, foi menor do relatado na literatura em perdizes de maior idade. Isso sugere a possibilidade de que os testículos das perdizes possam sofrer algum grau de degeneração à medida que os animais envelheçam. Padrão semelhante foi relatado por Tabatabaei et al. (2010) em galo indiano, em que os defeitos morfológicos dos espermatozoides aumentaram com a idade. Isso contrasta com o observado em *Houbara bustard* (*Chlamydotis undulata*),

onde a morfologia espermática não diferiu entre animais jovens e adultos (Meunier et al., 2024).

## 7. CONCLUSÕES

A morfometria e histomorfometria testicular das perdizes (*Rhynchotus rufescens*) sofrem mudanças significativas com o avanço da idade e são influenciadas pelo fotoperíodo. A maturidade sexual foi evidenciada pela presença de todos os tipos celulares da espermatogênese aos dez meses em perdizes nascidas no início da estação reprodutiva, ressaltando a importância da fotoestimulação para desenvolvimento testicular completo. Enquanto aos animais nascidos no final da estação reprodutiva, todos os tipos celulares foram observados aos nove meses de idade, com desenvolvimento testicular semelhante ao reportado em adultos.

A coleta de sêmen em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) com idades entre nove e doze meses foi realizada com sucesso utilizando a técnica de eletroestimulação, demonstrando ser método seguro e altamente eficaz. A confirmação da produção de gametas funcionais em perdizes jovens reforça o potencial uso desses animais em programas de reprodução assistida, ampliando as oportunidades para os criatórios com fins comerciais e de conservação.

## 8. REFERENCIAS

Abah K, Fontbonne A, Partyka A, Nizanski W (2023) Effect of male age on semen quality in domestic animals: potential for advanced functional and translational research? **Veterinary Research Communications**. 47:1125–1137.

Abdul-Rahman I, Robinson J, Obese F, Jeffcoate I, Awumbila B (2016) Effects of season on the reproductive organ and plasma testosterone concentrations in guinea cocks (*Numida meleagris*). **Poultry Science**. 95:636–644.

Abdul-Rahman I, Jeffcoate I, Yeboah F (2018) Age-related changes in the gross anatomy of the reproductive organs and associated steroid hormone profiles in male and female guinea fowls (*Numida meleagris*). **Veterinary and Animal Science**. 6:41–49.

Albuquerque N, Guimarães D, Pendu Y, Silva J, Tavares H (2008) Produção e reprodução de animais silvestres o caititu (*Tayassu tajacu*). In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Imperatriz – MA.

Alonso J, Magaña M, Palacín C, Martín C (2010) Correlates of male mating success in great bustard leks: the effects of age, weight, and display effort. **Behav Ecol Sociobiol**. 64:1589–1600.

Alves M (2012) **Comportamento de casais *Rhynchotus rufescens* em cativeiro: Relação com imobilidade tônica e eficiência reprodutiva**. 125 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Unesp, Jaboticabal.

Ahmed B, Kalla D, Saleh B, Ibrahim T, Shuaibu A (2022) Seasonal Variations in Live Weight and Testicular Histomorphometry of Two Strains of Helmeted Guinea Fowls (*Numida meleagris*). **Nigerian Journal of Animal Science and Technology**. 5(4):58-70.

Baraldi-Artoni S, Bottino F, Oliveira D, Franzo V, Amoroso L, Orsi A, Cruz C (2007) Morphometric study of *Rhynchotus rufescens* testis throughout the year. **Biology**. 67:363-367.

Bonato M, Cornwallis C, Malecki I, Rybnik-Trzaskowska P, Cloete S (2012) The effect of temperature and pH on the motility and viability of ostrich sperm. **Animal Reproduction Science**. 133:123–128.

Burrow W, Quinn J (1935) The Collection of Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey. **Poultry Science**. 16:19-24.

Branson W, Ritchie B, Harrison B, Harrison L (1994) Avian medicine: principles and application. 29:748–804.

Brien E, Sabater A, Toledano-Diaz A, Castaño C, Aguilar G, Hidalgo C, Balsera R, Cubero D (2023) Effect of midazolam sedation on sperm quality in capercaillie,

following a protocol developed in chicken and partridge as model. **Theriogenology Wild.** 100058.

Bruneli F, Tholon P, Isaac F, Damasceno P, Tonhati H, Queiroz S (2005) Caracterização da reprodução de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) em cativeiro. **Ars Veterinária.** 21:272-280.

Campos J. (2000) **Avicultura (razões, fatos e divergências)**. Belo Horizonte. Editora FEP-MVZ.

Carnio A, Moro M, Giannoni M (1999) Estudos para a criação e reprodução em cativeiro da ave silvestre, *Rhynchotus rufescens* (Tinamiformes), com potencial para exploração zootécnica. **Ars Veterinária**, 15:140-143.

Carvalho R (2016) **Morfometria testicular, escores de crista, cloaca e de pé em galos de matriz pesada em duas idades e três categorias de peso corporal**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte.

Calhim S, Birkhead T (2009) Intraspecific variation in testis asymmetry in birds: evidence for naturally occurring compensation. **Proc. R. Soc. B.** 276:2279-2284.

Castillo A, Marzoni M, Pirone A, Romboli I (2012) Histological observations in testes of hybrids of *Gallus gallus* x *Phasianus colchicus*. **Avian Biology Research.** 5 (1):21-30.

Cavalcante A.K (2006) **Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro: Comparação entre os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo – USP.

Comizzoli P, Crosier A, Songsasen N, Gunther M, Howard J, Wildt D (2009) Advances in reproductive science for wild carnivore conservation. **Reproduction in Domestic Animals.** 44:47-52.

Correia L (2017) **Avaliação da endogamia, características reprodutivas e de crescimento em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

Correia L (2021) **Avaliação de características produtivas e reprodutivas de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) selecionadas para crescimento corporal**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) - Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

Chidozie O, Ugochukwu N, Kenneth A (2010) Morphometric study of the testes of the nigerian local breed of Chicken. **Animal Research International.** 7:1163-1168.

Deviche P, Hurley L, Fokidis H (2011) Avian Testicular Structure, Function, and Regulation. **Hormones and Reproduction of Vertebrates** 4:27–70.

Dogliero A, Rota A, Lofiego R, von Degerfeld MM, Quaranta G (2016) Semen collection and spermatozoa characteristics in the kea parrot (*Nestor notabilis*). **J. Avian Med. Surg.** 31:24-28.

Frediani M (2016) **Avaliação da técnica de eletroestimulação para colheita de sêmen m diversas ordens de aves.** Dissertação (mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo – USP.

Frediani M, Guida F, Salgado P, Gonçalves D, Blank M, Novaes G, Pereira R (2019) Semen collection by electro-stimulation in a variety of bird orders. **Theriogenology.** 125:140-151.

Friedmann H (1927) Testicular asymmetry and sex ratio in birds. **Biological Bulletin.** 52:197-207.

Fischer D, Neumann D, Purchase C, Bouts T, Meinecke-Tillmann S, Wehrend A, Lierz M (2014) The Use of Semen Evaluation and Assisted Reproduction in Spix's Macaws in Terms of Species Conservation. **Zoo Biology.** 33: 234–244.

Froman D, Feltmann A (1998) Sperm mobility: a quantitative trait of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Biol Reprod.** 58:379-384.

Froman D, Kirby J, Proudman J (2004) Reprodução em aves: Macho e fêmea. In: Hafez B. & Hafez E.S.E. **Reprodução Animal.** 7:237-257.

Garamszegi L Z, Eens M, Hurtrez-Boussès S, Moller A P (2005) Testosterone, testes size, and mating success in birds: a comparative study. **Hormones and Behavior.** 47:389-409.

Gerzilov V, Bochukov A, Penchev G, Petrov P (2016) Testicular development in the muscovy duck (*Cairina moschata*). **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine.** 19:8-18.

Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M (2008) Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). **Anim Reprod Sci.** 104:359-369.

Góes P, Cavalcante A, Tavian A, Felipe L, Santos E, Nichi M, Queiroz S, Barnabe R, Barnabe V (2011) Análise espermiática de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 48:370-377.

Grosso J, Filho T (2024) Genética e melhoramento avícola. In.: Mendes A, Hunka E, Garcia R (Eds. 3) **Produção de Frangos de Corte.** Campinas: FACTA, p.17-38.

Hafez E, Ainudeen M, Rosnina Y (2004) Hormones, Growth Factors, and Reproduction. In: Hafez B. & Hafez E.S.E, (Eds. 7). **Reprodução Animal.** p. 33-54.

Harrison J, Wasmund D (1984) Preliminary studies of electroejaculation to facilitate manual semen collection in psittacines. **Proc Annu Conf Assoc Avian Vet**; p.207–213.

Hassanzadeh B, Nabipour A, Rassouli M, Dehghani H (2013) Microanatomical study of testis in juvenile ostrich (*Struthio camelus*). **Anatomical Science International**. 88:134–140.

Hillman S, e Hedrick M (2015) A meta-analysis of in vivo vertebrate cardiac performance: implications for cardiovascular support in the evolution of endothermy. **Journal Experimental Biology**. 218:1143-1150.

Hocking P (1992) Bilateral testicular asymmetry and supernumerary testes in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **British Poultry Science**. 33:455- 460.

Kanatiyanont N, Kornkaewrat K, Suthanmapinunt P, Pinyopummin A (2012) Effect of Semen Collection Techniques on Semen Quality and Sperm Motility Parameters in Siamese Fighting Cock (*Gallus gallus*). **The Thai Journal of Veterinary Medicine**. 42(4): 439-445.

Klein S, Bédécarrats G, Zuidhof M (2018) The effect of rearing photoperiod on broiler breeder reproductive performance depended on body weight. **Poultry Science**. 97:3286–3294.

Lanna L (2012) **Morfologia testicular e reserva espermática na codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*)**. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte.

Lake P, KING A, McLelland J (1982) Male genital organs. In.: Raikow R. **Form, and functions in birds**. p 97.

Lawson J, Guo Y, Yan Z, Wang X (2022) Morpho-Histology and Morphometry of Chicken Testes and Seminiferous Tubules among Yellow-Feathered Broilers of Different Ages. **Veterinary Sciences**. 9:485.

Leon H, Porrás A, Galina C, Navarro-Fietro R (1991) Effect of the collection method on semen characteristics of Zebu and European type cattle in the tropics. **Theriogenology**. 36:349-355.

Lewis P (2006) A review of lighting for broiler breeders. **British Poultry Science**. 47:393-404.

Lierz M, Reinschmidt M, Müller H, Wink M, Neumann D (2013) A novel method for semen collection and artificial insemination in large parrots (*Psittaciformes*). **Scientific Reports** 3:1-8.

Lierz M, Petritz O, Samour J (2016) **Current therapy in avian medicine and surgery**. ELSEVIER. p 433.

Lukaszewicz E, Kowalczyk A, Jerysz A (2021) Characteristics of semen collected from gander included in the genetic resources conservation program. **Poultry Science**. 100:101314.

Jiménez S (2013) **Efecto de la edad del gallo sobre la calidad del semen**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacan-México.

Madekurozwa M, Chabvepi S, Matema S, Teerds K (2002) Relationship between seasonal changes in spermatogenesis in the juvenile ostrich (*Stuthio camelus*) and the presence of the LH receptor and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. **Reproduction**. 123:735-742.

Mandal D, Kumar M, Tyagi S (2009) Effect of age on spermiogram of Holstein Friesian x Sahiwal crossbred Bulls. **Animal**. 4:595-603.

Marco-Jiménez F, Puchades S, Gadea J, Vicente J.S, Viudes-de-Castro, M.P (2005) Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. **Theriogenology**. 64:1756-1765.

Marvan, F (1969) Postnatal development of the male genital tract of the *Gallus domesticus*. **Anatomischer Anzeiger**. 124:443-462.

Menegheti j, Frozi m, Burger M (1985) The Grow curve of the Red-Winged Tinamou (*Rhynchotus rufescens*, TEMMINCK, 1815) (AVES, TINAMIDAE). **Iheringia Serie Misc** 1:47-54.

Meunier L, Sorci G, Vieira C, Hingrat Y, Jalme M, Carreira J (2024) Sperm morphology, and macro and microscopic description of male and female reproductive tract in the North African houbara bustard (*Chlamydotis undulata*). **Theriogenology Wild**. 100082.

Moraes I (2004) Reprodução das aves. Disponível em [www.uff.br/fisiovet](http://www.uff.br/fisiovet). Consultado [03/03/2024]

Moro E, Joji A, Malheiros E (2002) Avaliação dos níveis de proteína da dieta sobre a idade à maturidade sexual e produção de ovos de perdiz (*Rhynchotus rufescens* Temminek). **Acta Scientiarum**. 24:997-1000.

Moro E, Arika J, Souza P (2006) Rendimento de carcaça e composição química da carne da perdiz nativa (*Rhynchotus rufescens*). **Ciência Rural**. 36:258-262.

McGeady T, Quinn P, Fitzpatrick E, Ryan M (2006) **Veterinary Embriology**. Blackwell Publishing, Oxford. 329p.

Noirault J, Brillard J, Bakst M (2006) Spermatogenesis in the turkey (*Meleagris gallopavo*): Quantitative approach in immature and adult males subjected to various photoperiods. **Theriogenology**. 65:845-859.

Olea G, Aguirre M, Lombardo D (2018) Anatomical, histological and immunohistochemical study of testicular development in *Columba livia* (Aves: Columbiformes). **Acta Histochemica**. 120:446-455.

Orians G (1969) On the Evolution of mating systems in birds and mammals. **American Naturalist**. 103:589-603.

Orlu E, Egbunike G (2010) Breed and Seasonal Variation in the Testicular Histometric Parameters and Germ Cell Populations of the Barred Plymouth Rock and the Nigerian Indigenous Breeds of the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). **Journal of Applied Sciences**. 10:1271-1278.

Paranzini C, Correia L, Camargo L, Silva K, França T, Silva J, Veiga N, Souza F (2018) Feasibility of semen collection in red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*) by manual stimulation and seasonality implications. **Theriogenology**. 107:36-40.

Peixoto J (2002) **Aspectos comportamentais de Perdiz (*Rhynchotus rufescens*) em cativeiro durante a fase reprodutiva. Um estudo de caso**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga.

Pough F, Heiser J, McFarland W (1999) A vida dos vertebrados. **Ateneu Editora**. 2:798p.

Pollock C, Orosz S (2002) Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. **The veterinary Clinics Exotic Animal**. 5:441-474.

Rakha B, Ansari M, Akhter S, Blesbois E (2017) Effect of season and age on Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) semen characteristics: A 4-year retrospective study. **Theriogenology**. 99:105-110.

Revorêdo R (2021) **Colisão de aves marinhas migratórias em linha de energia no nordeste brasileiro: Avaliação espaço-temporal e descrição da histologia gonadal em áreas não reprodutivas com fins de conservação**. Dissertação (Mestrado em Biologia Estrutural e Funcional) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN.

Samuelson D (2007) **Textbook of Veterinary Histology**. Saunders, St. Louis, Missouri. p. 546.

Santos T, Murakami A, Oliveira C, Costa P (2012) Desenvolvimento corporal e testicular em machos de codornas de corte e de postura de 25 a 360 dias. **Pesq. Vet. Bras**. 32(11):1205-1212.

Serebrovski A, Sokolovskaja II (1934) Electroejakuljacia. **Ptie. Prob. Zhivotu**. 5:57p.

Sick H (1997). **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997. 153-167 p.

Silva K (2020) **Efeito do controle de luz sobre as características espermáticas e proteômica do sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*)**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu.

Sousa J (2007) **Morfologia dos órgãos reprodutores masculinos da ema (*Rhea americana americana*)**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo – USP.

Schneider H, Fischer D, Mathews S, Failing K, Delehanty D, Lierz M (2019) Semen collection, semen analysis and artificial insemination in Columbian sharp-tailed grouse (*Tympanuchus phasianellus columbianus*) as part of a species conservation project. **Theriogenology**. 132:128-137.

Shaheen M, Aslam S, Mehmood S, Tariq M, Abbas Y, Ashfaq H, Ahmad S (2022) Effects of age, body weight, semen collection frequency and holding duration on semen traits of broiler breeder reared under different housing systems. **Tropical Animal Health and Production**. 55:21.

Shi L, Li Y, Yuan J, Ma H, Wang P, Ni A, Ge P, Chen C, Li D, Sun Y, Chen J (2021) Effects of age at photostimulation on sexual maturity and reproductive performance in rooster breeders. **Poultry Science**. 100:101011.

Shil S, Quasem A, Rahman M (2015) Histological and morphometric analyses of testes of adult quail (*Coturnix coturnix japonica*) of Bangladesh. **International Journal of Morphology** 33:100-104.

Tabatabaei S, Chaji M, Mohammadabadi T (2010) Correlation between age of rooster and semen quality in Iranian indigenous broiler breeder chicken. **J. Anim. Vet. Adv.** 9:195-198.

Tae H, Jang B, Ahn D, Choi E, Kang H, Kim N, Lee J, Park S, Yang H, Kim I (2005) Morphometric studies on the testis of Korean Ring-necked Pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*). **Veterinary Research Communications**. 29:629-643.

Teixeira M, Malhado A, Soares S, Fontenele J (2012) Morfofisiologia da reprodução das aves: Desenvolvimento embrionário, anatomia e histologia do sistema reprodutor. **Acta Veterinaria Brasilica**. 6:165-176.

Tillmann J (2009) An ethological perspective on defecation as an integral part of anti-predatory behaviour in the grey partridge (*Perdix perdix* L.) at night. **J Ethol**. 27:117–124.

Tholon P, Freitas E, Queiroz S (2008) estimativas de parâmetros genéticos para pesos corporais em perdizes (*Rhyrchotus rufescens*) criadas em cativeiro. **Caatinga**. 21:48-61.

Trevisan J (2013) **Influência dos danos oxidativos na qualidade espermática em bovinos de diferentes idades**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, SP.

UICN (2023). Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN. Versión 2023-1. <https://www.iucnredlist.org>. Consultado [03/03/2024]

Vogas J (2010). **Criopreservação de sêmen e avaliação histológica e funcional do testículo de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805)**. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Viçosa.

Williams T (2018) Avian reproduction – Overview (Wild Birds). **Encyclopedia of Reproduction**. 6:595-599.

**APÉNDICE A**

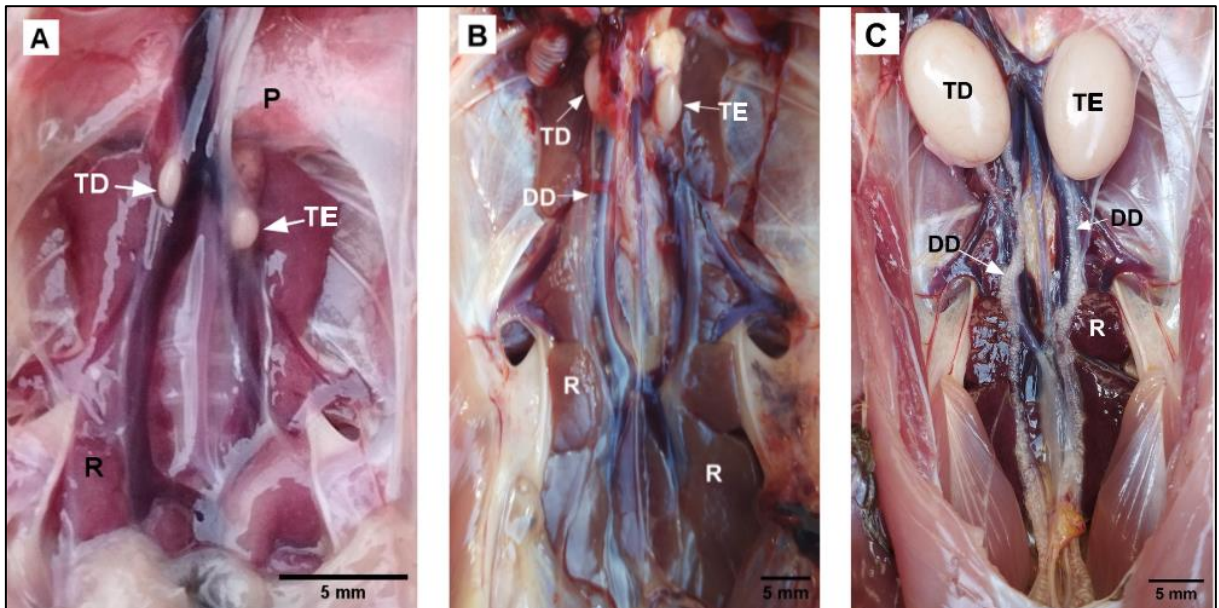


Figura 1A. Fotografias dos testículos de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) em diferentes fases de crescimento. (A) 1 mês de idade; (B) 6 meses de idade; (C) 10 meses de idade em estação reprodutiva. Testículo esquerdo (TE), testículo direito (TD), rin (R), pulmão (P); ducto deferente (DD).

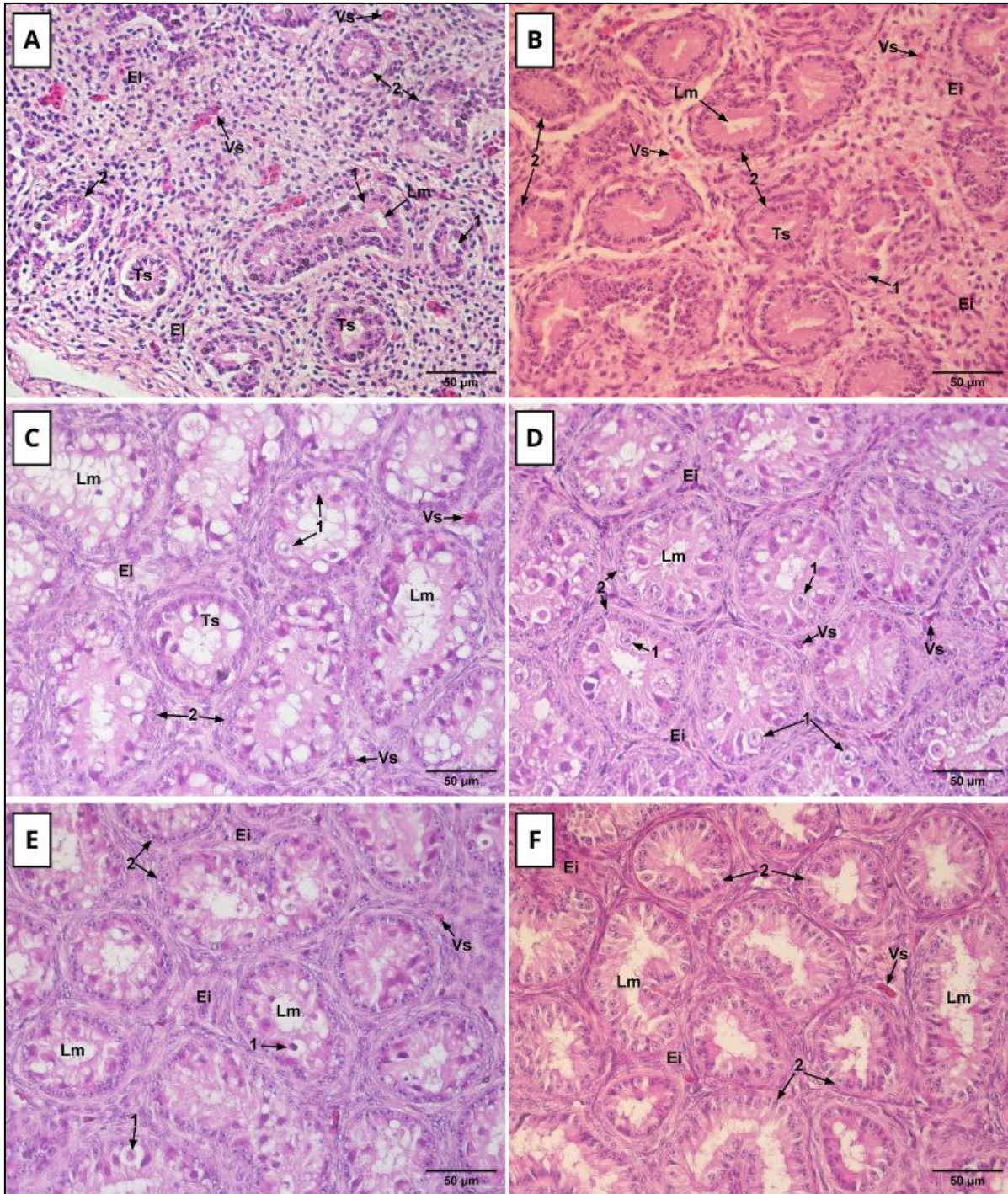


Figura 2A. Fotografias histológicas dos testículos da perdiz (*Rhynchotus rufescens*) durante o crescimento entre 1 e 6 meses de idade em estação não reprodutiva. (A-F) aumento de 40x. (A) 1 mês; (B) 2 meses; (C) 3 meses; (D) 4 meses; (E) 5 meses; (F) 6 meses. Células de Sertoli (1); espermatogônias (2); túbulo seminífero (Ts); lúmen seminífero (Lm); espaço intertubular (Ei); vaso sanguíneo (Vs).

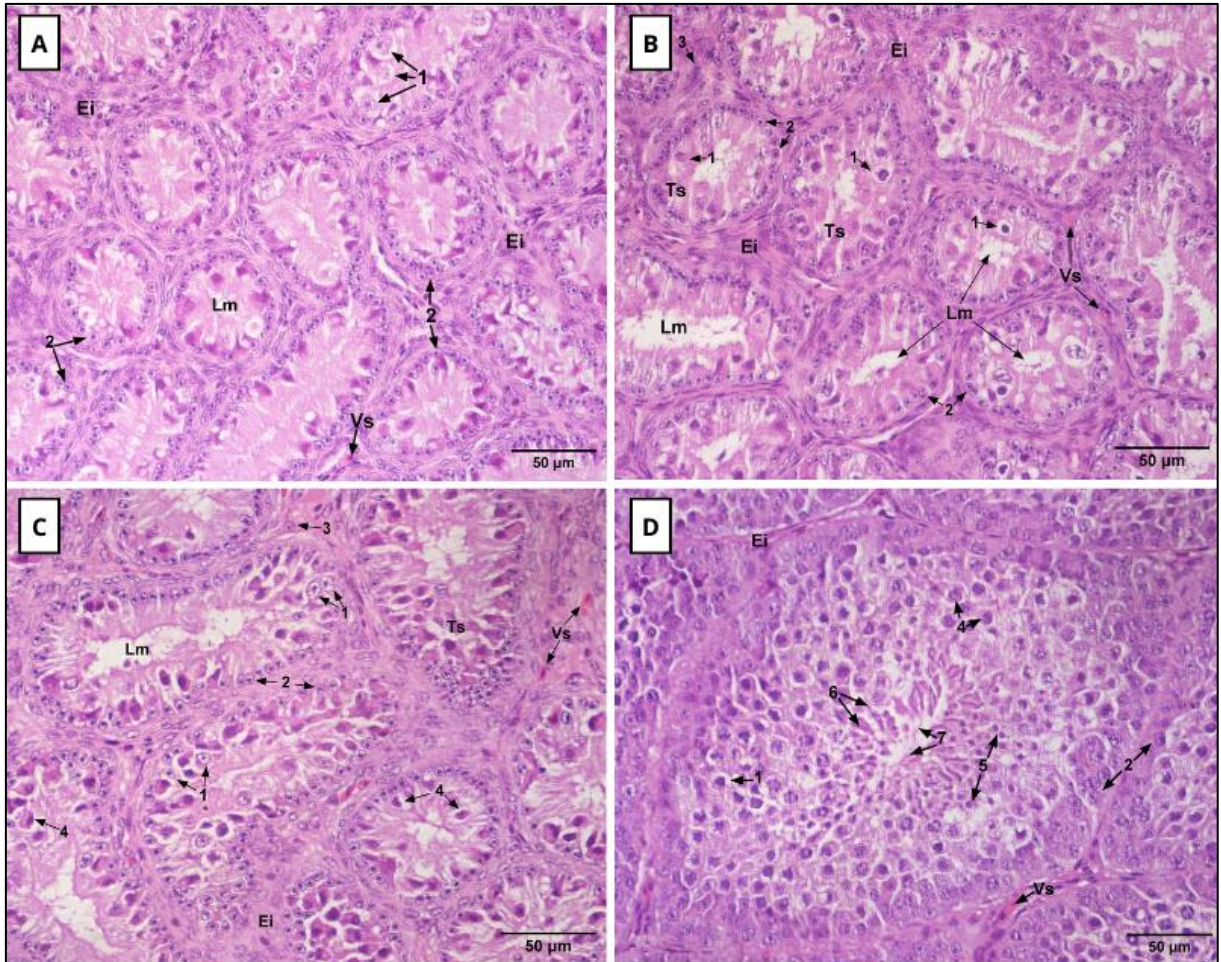


Figura 3A. Fotografias histológicas dos testículos da perdiz (*Rhynchotus rufescens*) durante o crescimento entre 7 e 10 meses de idade em estação não reprodutiva. (A-D) aumento de 40x. (A) 7 meses; (B) 8 meses; (C) 9 meses; (D) 10 meses. Células de Sertoli (1); espermatogônias (2); Células de Leydig (3); espermatócitos (4); espermatídes redondas (5); espermatídes alongadas (6); espermatozoides; túbulo seminífero; (Ts); lúmen seminífero (Lm); espaço intertubular (Ei); vaso sanguíneo (Vs).

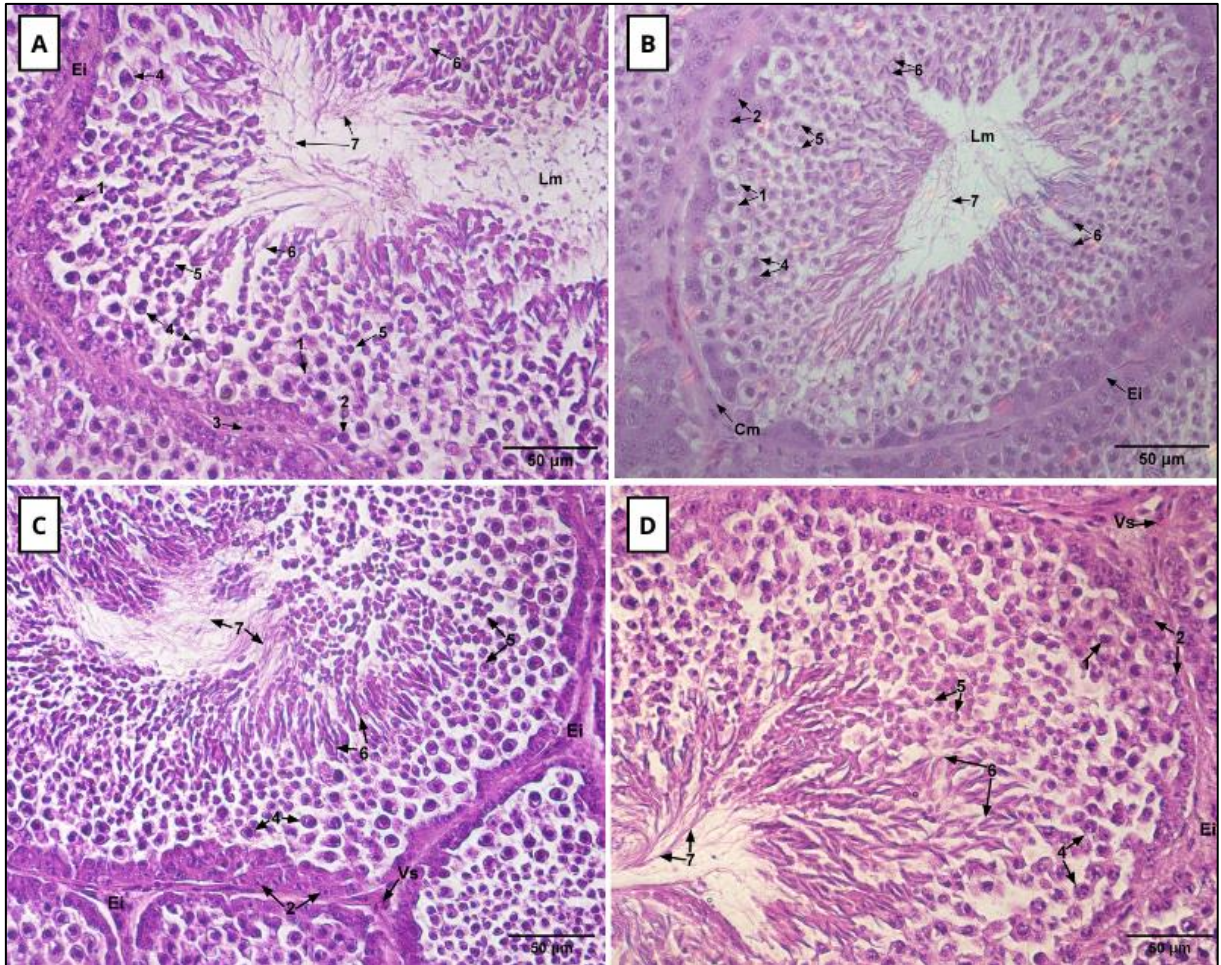


Figura 4A. Fotografias histológicas dos testículos da perdiz (*Rhynchotus rufescens*) durante o crescimento entre 9 e 12 meses de idade em estação reprodutiva. (A-D) aumento de 40x. (A) 9 meses; (B) 10 meses; (C) 11 meses; (D) 12 meses. Células de Sertoli (1); espermatogônias (2); Células de Leydig (3); espermatócitos (4); espermátides redondas (5); espermátides alongadas (6); espermatozoides; túbulo seminífero; (Ts); lúmen seminífero (Lm); espaço intertubular (Ei); células mioepiteliais (Cm); vaso sanguíneo (Vs).

**APÊNDICE B**

Tabela 1B. Média e Desvio Padrão (DP) do peso corporal, peso testicular e índices gonadossomático (IGS) de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) durante o crescimento.

Estação não reprodutiva					
Idade (meses)	N	Peso corporal (g)	Peso médio testicular (g)	Peso de ambos testículos (g)	IGS (%)
<b>Mês 1</b>	4	82.75 ± 12.01 <sup>f</sup>	0.0016 ± 0.0004 <sup>e</sup>	0.0033 ± 0.0008 <sup>d</sup>	0.0041 <sup>c</sup>
<b>Mês 2</b>	4	189.00 ± 28.95 <sup>e</sup>	0.0058 ± 0.0013 <sup>de</sup>	0.0116 ± 0.0027 <sup>de</sup>	0.0061 <sup>bc</sup>
<b>Mês 3</b>	4	387.50 ± 36.74 <sup>d</sup>	0.0148 ± 0.0021 <sup>c</sup>	0.0296 ± 0.0041 <sup>ce</sup>	0.0076 <sup>ab</sup>
<b>Mês 4</b>	4	459.75 ± 97.22 <sup>cd</sup>	0.0184 ± 0.0058 <sup>c</sup>	0.0367 ± 0.0113 <sup>bc</sup>	0.0080 <sup>ab</sup>
<b>Mês 5</b>	4	650.75 ± 90.14 <sup>b</sup>	0.0304 ± 0.0110 <sup>b</sup>	0.0608 ± 0.0237 <sup>ab</sup>	0.0092 <sup>ab</sup>
<b>Mês 6</b>	2	567.50 ± 112.58 <sup>bc</sup>	0.0173 ± 0.0047 <sup>c</sup>	0.0346 ± 0.0092 <sup>bc</sup>	0.0061 <sup>bc</sup>
<b>Mês 7</b>	2	560.00 ± 0.00 <sup>bc</sup>	0.0147 ± 0.0004 <sup>cd</sup>	0.0294 ± 0.0000 <sup>bcd</sup>	0.0052 <sup>bc</sup>
<b>Mês 8</b>	2	667.50 ± 66.39 <sup>ab</sup>	0.0350 ± 0.0098 <sup>ab</sup>	0.0701 ± 0.0236 <sup>ab</sup>	0.0108 <sup>ab</sup>
<b>Mês 9</b>	1	770.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.0895 ± 0.0077 <sup>ab</sup>	0.1791 ± 0.0000 <sup>ab</sup>	0.0233 <sup>ab</sup>
<b>Mês 10</b>	1	782.50 ± 37.52 <sup>a</sup>	0.2007 ± 0.0981 <sup>a</sup>	0.4015 ± 0.2382 <sup>a</sup>	0.0523 <sup>a</sup>
Estação reprodutiva					
<b>Mês 9</b>	1	690.00 ± 0.00 <sup>A</sup>	1.92 ± 0.38 <sup>A</sup>	3.84 ± 0.00 <sup>A</sup>	0.5577 <sup>A</sup>
<b>Mês 10</b>	1	665.00 ± 0.00 <sup>B</sup>	1.37 ± 0.10 <sup>A</sup>	2.75 ± 0.00 <sup>A</sup>	0.4132 <sup>A</sup>
<b>Mês 11</b>	2	637.50 ± 20.2 <sup>B</sup>	1.17 ± 0.24 <sup>A</sup>	2.33 ± 0.21 <sup>A</sup>	0.3666 <sup>A</sup>
<b>Mês 12</b>	2	687.50 ± 2.88 <sup>A</sup>	1.54 ± 0.47 <sup>A</sup>	3.08 ± 0.64 <sup>A</sup>	0.4479 <sup>A</sup>

Diferenças significativas em estação não reprodutiva são indicadas por diferentes letras minúsculas ( $p < 0,05$ ). Diferenças significativas em estação reprodutiva são indicadas por diferentes letras maiúsculas ( $p < 0,05$ ).

\*Média ± desvio padrão.

Tabela 2B. Variação histomorfométrica dos testículos da perdiz *Rhynchotus rufescens* durante o crescimento.

Estação não reprodutiva					
Idade (meses)	N	Proporção de túbulo seminífero (%)	Diâmetro de tubulo seminífero (µm)	Espessura do epitélio seminífero (µm)	Volume de Túbulo Seminífero (mL)
<b>Mês 1</b>	8	35.42 ± 11.11 <sup>f</sup>	48.89 ± 6.99 <sup>g</sup>	6.29 ± 1.37 <sup>h</sup>	0.0011 ± 0.0002 <sup>h</sup>
<b>Mês 2</b>	8	50.38 ± 7.59 <sup>e</sup>	56.75 ± 5.42 <sup>f</sup>	19.00 ± 1.98 <sup>g</sup>	0.0062 ± 0.0020 <sup>g</sup>
<b>Mês 3</b>	8	56.60 ± 5.23 <sup>d</sup>	68.08 ± 5.78 <sup>c</sup>	23.64 ± 2.09 <sup>d</sup>	0.0168 ± 0.0029 <sup>f</sup>
<b>Mês 4</b>	8	57.31 ± 6.61 <sup>d</sup>	65.05 ± 11.61 <sup>d</sup>	22.17 ± 3.41 <sup>e</sup>	0.0214 ± 0.0070 <sup>e</sup>
<b>Mês 5</b>	8	61.71 ± 5.11 <sup>c</sup>	71.85 ± 2.59 <sup>b</sup>	25.44 ± 2.48 <sup>c</sup>	0.0376 ± 0.0138 <sup>d</sup>
<b>Mês 6</b>	4	52.12 ± 5.47 <sup>e</sup>	64.67 ± 5.33 <sup>de</sup>	21.23 ± 1.75 <sup>f</sup>	0.0178 ± 0.0022 <sup>f</sup>
<b>Mês 7</b>	4	58.75 ± 5.21 <sup>cd</sup>	62.02 ± 1.97 <sup>ef</sup>	21.09 ± 1.24 <sup>f</sup>	0.0173 ± 0.0015 <sup>f</sup>
<b>Mês 8</b>	4	67.70 ± 5.51 <sup>b</sup>	72.85 ± 2.55 <sup>b</sup>	25.43 ± 1.53 <sup>c</sup>	0.0468 ± 0.0093 <sup>c</sup>
<b>Mês 9</b>	2	65.92 ± 4.63 <sup>b</sup>	85.52 ± 5.70 <sup>ab</sup>	28.93 ± 0.53 <sup>b</sup>	0.1181 ± 0.0083 <sup>b</sup>
<b>Mês 10</b>	2	77.16 ± 3.42 <sup>a</sup>	160.04 ± 33.47 <sup>a</sup>	57.36 ± 12.19 <sup>a</sup>	0.3119 ± 0.1376 <sup>a</sup>
Estação reprodutiva					
<b>Mês 9</b>	2	84.82 ± 2.96 <sup>A</sup>	343.49 ± 19.57 <sup>A</sup>	99.17 ± 6.81 <sup>B</sup>	3.26 ± 0.11 <sup>A</sup>
<b>Mês 10</b>	2	82.10 ± 3.05 <sup>B</sup>	318.11 ± 18.01 <sup>B</sup>	99.43 ± 8.15 <sup>B</sup>	2.25 ± 0.08 <sup>B</sup>
<b>Mês 11</b>	4	77.70 ± 3.42 <sup>C</sup>	276.22 ± 20.62 <sup>C</sup>	90.62 ± 6.80 <sup>C</sup>	1.80 ± 0.13 <sup>C</sup>
<b>Mês 12</b>	4	81.86 ± 2.52 <sup>B</sup>	342.07 ± 38.75 <sup>A</sup>	107.08 ± 9.56 <sup>A</sup>	2.52 ± 0.48 <sup>B</sup>

Diferenças significativas em estação não reprodutiva são indicadas por diferentes letras minúsculas ( $p < 0,05$ ). Diferenças significativas em estação reprodutiva são indicadas por diferentes letras maiúsculas ( $p < 0,05$ ).

\*Média ± desvio padrão.