

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

THAMIRIS PINHEIRO MELO

**EFEITO DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NA
MATURIDADE SEXUAL EM TOUROS DA RAÇA NELORE**

UBERLÂNDIA

2023

THAMIRIS PINHEIRO MELO

**EFEITO DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NA
MATURIDADE SEXUAL EM TOUROS DA RAÇA NELORE**

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Médico Veterinário, no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

**Orientadora: Prof. Dra.
Teresinha Inês de Assumpção**

UBERLÂNDIA

2023

THAMIRIS PINHEIRO MELO

**EFEITO DA GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA NA
MATURIDADE SEXUAL EM TOUROS DA RAÇA NELORE**

Monografia apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau de
Médico Veterinário, no curso de
Medicina Veterinária da Universidade
Federal de Uberlândia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^{oa}. Dra. Teresinha Inês de Assumpção
(Faculdade de Medicina Veterinária da UFU)

Prof^a. Dra. Renata Lançoni
(Faculdade de Medicina Veterinária da UFU)

Dra. Ana Cláudia Fagundes
(PPGCV - Faculdade de Medicina Veterinária da UFU)

Uberlândia, 18 de junho de 2023

DEDICATÓRIA

Às minhas queridas avós Amélia e Jovina (*in memoriam*), cujo empenho em me educar sempre veio em primeiro lugar. Aqui estão os resultados dos seus esforços. Com muita gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde, sabedoria, força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Aos meus pais, Wanderley de Oliveira e Lídia Eduarda por serem minha fortaleza e com muito amor, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. E, ao meu irmão Rafael Pinheiro, por ser meu maior presente, meu companheiro e meu motivo para sempre ser melhor. Amo vocês.

Ao meu amigo Victor Souza e meu primo Pedro Augusto pela amizade, risadas e todo carinho que tiveram comigo.

Aos meus amigos Bianca de Jesus, Verônica Idy, Amanda Cardoso, Maria Vitória, Pedro Barros, Maria Clara e Ivy Cury, pelos incríveis momentos juntos.

A minha orientadora Teresinha Inês de Assumpção por ter sido tão solícita em meu trabalho, por ser uma constante fonte de motivação e incentivo ao longo de todo o projeto. A Professora Renata, Natascha, ao Neimar e a Graciele por toda ajuda.

E a todos meus familiares e amigos que de alguma forma direta ou indireta auxiliaram para o trabalho ser concluído.

RESUMO

Os andrógenos desempenham um papel crucial no desenvolvimento sexual, saúde reprodutiva e homeostase metabólica em machos. A gonadotrofina coriônica humana (hCG) tem uma ação semelhante ao hormônio luteinizante, estimulando a produção de testosterona nos testículos e contribuindo para o processo de espermatogênese. Este estudo teve como objetivo investigar o efeito da hCG na maturidade sexual de touros da raça Nelore, visando antecipar a entrada na reprodução. Vinte touros Nelore com idades entre 14 e 16 meses foram divididos em dois grupos: Grupo 1 (controle) e Grupo 2 (tratados com 2500 UI de hCG intramuscular a cada 7 dias durante 28 dias). Todos os animais foram submetidos a avaliações clínicas em cada etapa experimental, assim como 30 dias após o término das aplicações. Foram realizadas medições de peso e clínico-reprodutivas dos animais. O sêmen foi coletado por eletroejaculação e foram realizadas análises das características físicas e morfológicas. Os resultados demonstraram que não houve diferenças significativas entre os animais tratados e o grupo controle em relação ao perímetro escrotal, morfologia espermática (defeitos totais, maiores e menores) e concentração espermática. No entanto, os animais tratados apresentaram valores de motilidade e vigor espermático menores em comparação com os animais do grupo controle. Portanto, a utilização de hCG em machos da raça Nelore de 14 a 16 meses não demonstrou eficácia em antecipar a maturidade sexual.

Palavras-chave: reprodução, bovinos, sêmen, morfologia espermática.

ABSTRACT

Androgens play a crucial role in sexual development, reproductive health, and metabolic homeostasis in males. Human chorionic gonadotropin (hCG) has a similar action to luteinizing hormone, stimulating testosterone production in the testicles and contributing to the process of spermatogenesis. This study aimed to investigate the effect of hCG on the sexual maturity of Nelore bulls, with the purpose of advancing their entry into reproduction. Twenty Nelore bulls aged 14 to 16 months were divided into two groups: Group 1 (control) and Group 2 (treated with 2500 IU of intramuscular hCG every 7 days for 28 days). All animals underwent clinical evaluations at each experimental stage, as well as 30 days after the end of the applications. Measurements of weight and reproductive parameters were performed. Semen was collected through electroejaculation, and analyses of physical and morphological characteristics were conducted. The results showed no significant differences between the treated animals and the control group regarding scrotal circumference, sperm morphology (total defects, major and minor), and sperm concentration. However, the treated animals exhibited lower values of sperm motility and vigor compared to the animals in the control group. Therefore, the use of hCG in 14 to 16-month-old Nelore males did not demonstrate efficacy in advancing sexual maturity.

Keywords: reproduction, cattle, semen, sperm morphology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 Espermatogênese, puberdade e maturidade sexual	9
2.2 Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)	10
2.3 Usos da Gonadotrofina Coriônica Humana	11
2.4 Perímetro escrotal e produção espermática	12
2.5 Avaliação Andrológica	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Animais e local de execução	14
3.2 Grupos experimentais	15
3.3 Coleta, preparação e análise das amostras	16
3.4 Análise estatística	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5 CONCLUSÃO	26
Referências	27

1 INTRODUÇÃO

A antecipação da maturidade sexual desempenha um papel fundamental no retorno financeiro de um rebanho, pois reduz a idade de entrada dos bovinos na reprodução e diminui os custos com alimentação e manejo dos animais (Barth e Ominsk, 2000; Lopez et al., 2006; Costa e Silva, 2013). Além disso, touros de maior precocidade e de maior libido apresentam melhores taxas de prenhez quando utilizados com grande número de vacas em estação de monta curta (Pineda, 2002; Santos et al., 2005).

De acordo com o IBGE (2020), cerca de 80% do rebanho bovino brasileiro é constituído pela raça zebuína (*Bos indicus*), que possui desvantagem reprodutiva quando comparado às raças taurinas (*Bos taurus*), principalmente devido desenvolvimento sexual tardio (Fields et al., 1982; Nogueira, 2004; Aponte et al., 2005). Portanto, é fundamental buscar melhorias genéticas para precocidade sexual nos zebuínos, assim como desenvolver técnicas de manejo para que os animais atinjam a maturidade sexual o mais cedo possível.

Os andrógenos, uma família de hormônios esteroides, desempenham um papel importante no desenvolvimento sexual, na saúde reprodutiva e na homeostase metabólica. Sendo que os andrógenos “clássicos”, testosterona e di-hidrotestosterona são hormônios esteroides sintetizados nas células de Leydig nos testículos a partir do colesterol, sob estímulo do hormônio luteinizante (LH). O aumento puberal da testosterona circulante e sua manutenção em concentrações séricas de machos adultos é responsável tanto por virilização quanto por efeitos anabolizantes, resultando em características sexuais secundárias masculinas, desenvolvimento muscular, mineralização óssea e estimulação da eritropoiese (Rohayem et al., 2020).

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) tem ação homóloga ao LH e estimula a produção endógena de testosterona nos testículos, podendo ser utilizada como teste dinâmico confiável para a avaliação da esteroidogênese testicular (Zucker et al., 2022). A administração de hCG induz um rápido aumento da concentração sérica de testosterona em várias espécies, incluindo touros (Sundby et al., 1975 e 1983), gatos (Memon et al., 1992 e 2001), cães (Kawakami et al., 1998), humanos (Christiansen et al., 2002), carneiros (Bartke et al., 1977; Shore et al., 2003) e alpacas (Zawam et al., 2020). A resposta esteroidogênica à estimulação de hCG também foi investigada como

um método para avaliação de distúrbios da função testicular em animais mais velhos (Clement et al., 1998).

A determinação da fertilidade de um macho é realizada com base em características tanto do próprio animal quanto do seu sêmen. Sendo que a seleção reprodutiva é fundamentada na avaliação clínica do indivíduo, que inclui a aferição de seu perímetro escrotal, o comportamento sexual e a análise das características físicas e morfológicas do sêmen (Fonseca et al., 1992; Chenoweth, 2011). O perímetro escrotal (PE) aumenta linearmente com a idade e o peso do animal, aumentando progressivamente com a puberdade, sendo posteriormente mais lento indicando a maturidade sexual (Quirino et al., 1998), e está diretamente ligada à capacidade e o número de espermatozoides produzidos e a reserva espermática (Vásquez et al., 2003).

Existem poucos estudos sobre a ação da hCG na maturidade sexual de touros, e ainda menos em animais de raças zebuínas. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar a influência da hCG no desenvolvimento testicular e nos parâmetros seminais em machos da raça Nelore com idades entre 14 e 16 meses.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espermatogênese, puberdade e maturidade sexual

A espermatogênese é o processo pelo qual as células-tronco multipotentes primitivas se dividem seja para se autorrenovar, ou para produzir células filhas resultando na evolução de espermatogônia até espermatozoide. Esse processo ocorre no interior dos túbulos seminíferos, onde as células sofrem uma série contínua de divisões celulares e modificações de desenvolvimento, começando na base do túbulo seminífero e progredindo em direção à luz tubular (Aguilar et al., 2006).

O desenvolvimento da espermatogênese depende do suporte funcional das células de Sertoli (Martin-du Pan e Campana, 1993), dos níveis adequados de esteroides, gonadotrofinas e de fatores de crescimento (Sharpe, 1994). As gonadotrofinas controlam a proliferação e a diferenciação das células de Sertoli e Leydig desde a fase pós-natal, de modo que os esteroides e fatores de crescimento secretados por estas células têm ação direta ou indireta sobre o desenvolvimento das células germinativas (Aguilar et al., 2006).

A puberdade do animal é considerada quando ele é apto a produzir e liberar gametas viáveis e exibir comportamento sexual, ter o nível de testosterona circulante de no mínimo 1 ng/ml no sangue e o ejaculado conter, no mínimo, uma concentração de 50×10^6 células/ml e motilidade progressiva acima de 10% (Wolf et al., 1965; Hafez, 2004). Uma das primeiras mudanças no início da puberdade em touros é o aumento na frequência de pulsos de liberação de LH entre 12 e 20 semanas, que estimulam as células de Leydig a secretarem testosterona, necessária para a diferenciação do epitélio seminífero e para a espermatogênese (Hafez, 2004).

À medida que os touros alcançam a puberdade, seus testículos continuam a crescer e o número de espermatozoides no ejaculado aumenta até cerca de 18 a 24 meses de idade (Hafez, 2004). A maturidade sexual em bovinos é alcançada com o crescimento gonadal e corporal, bem como com mudanças quantitativas e qualitativas no sêmen. Geralmente, entre 16 e 20 semanas após a puberdade, os níveis de testosterona e o desenvolvimento sexual se estabilizam, e o sêmen do animal apresenta motilidade espermática progressiva mínima de 50% e morfologia espermática com no máximo 10% de defeitos maiores e 20% de defeitos menores (Lunstra et al., 1982; Rawlings et al., 2008).

A maturidade sexual em touros da raça Nelore é um marco importante no desenvolvimento reprodutivo desses animais. Geralmente, a maturidade sexual é alcançada entre 18 e 24 meses de idade, quando ocorrem mudanças hormonais e físicas significativas. Nesse estágio, os touros apresentam um bom tamanho testicular e uma produção crescente de espermatozoides no ejaculado. A qualidade do sêmen também melhora, com uma maior porcentagem de motilidade espermática e menor presença de anormalidades espermáticas. Essas mudanças são indicativas da capacidade reprodutiva plena dos touros Nelore (Lunstra et al., 1982; Rawlings et al., 2008).

2.2 Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)

A glicoproteína hCG é formada por uma subunidade α e outra β com peso molecular de 40.000 dáltons, sendo que a subunidade α possui 92 aminoácidos e duas cadeias de carboidrato, além disso, essa subunidade é similar à subunidade α do LH em humanos, suínos, ovinos e bovinos. Já a subunidade β possui 145 aminoácidos e cinco cadeias de carboidrato (Hafez, 2004). A hCG possui meia-vida de 20 horas (Kaltenbach e Dumn,

1980). A hCG é luteinizante e luteotrófico, possuindo baixa atividade de FSH e as células do sinciciotrofoblasto da placenta dos primatas são responsáveis pela síntese do hCG, que pode ser encontrado tanto no sangue como na urina (Hafez, 2004).

O efeito da hCG nos machos pode ser dividido em resposta primária e secundária. A resposta primária está relacionada à presença dessa gonadotrofina circulante e envolve dois mecanismos principais. Primeiramente, a hCG pode estimular a liberação de testosterona já presente nas células de Leydig, que são responsáveis pela produção desse hormônio masculino crucial. Além disso, a hCG também pode estimular a atividade da enzima 20 α -hidroxilase aumentando a conversão de colesterol em 20 α -hidroxicolesterol, um intermediário fundamental na síntese de testosterona (Sundby et al., 1975).

O efeito secundário da hCG ocorre quando os níveis dessa gonadotrofina começam a diminuir, mas ainda persistem por alguns dias após terem se tornando indetectáveis no plasma. Esse efeito pode ser explicado pelo aumento geral na produção de enzimas microssomais envolvidas na síntese de testosterona. Essas enzimas são responsáveis por catalisar as etapas subsequentes da síntese de testosterona, contribuindo para a manutenção dos níveis desse hormônio no organismo (Sundby et al., 1975).

Em resumo, a hCG exerce um efeito dual nos machos, estimulando tanto a liberação de testosterona quanto a atividade enzimática envolvida na sua síntese. Esses mecanismos desempenham um papel importante na regulação hormonal e na manutenção da função testicular adequada em machos.

2.3 Usos da Gonadotrofina Coriônica Humana

A administração de hCG tem mostrado resultados promissores não apenas em animais, mas também em humanos. A administração de hCG em gatos resultou em um aumento significativo na concentração sérica de testosterona, além de melhorar a motilidade e a viabilidade dos espermatozoides e nos cães houve um aumento na produção de testosterona e um efeito benéfico na qualidade espermática após a administração de hCG (Memon et al., 2001).

Em estudos realizados por Sundby et al. (1975) em touros, observou-se que os animais apresentaram níveis mais elevados de testosterona com pouca oscilação durante o dia após a administração de hCG. Além disso, Sundby et al. (1983)

concluíram que a administração de hCG não apenas aumentava os níveis séricos de testosterona em touros, mas também levava a um maior ganho de peso corporal médio dos animais.

Além disso, os estudos têm explorado o potencial diagnóstico do hCG em diferentes espécies. Em pesquisas conduzidas por Arighi et al. (1989), observou-se que a resposta esteroidogênica testicular ao hCG em garanhões foi utilizada como um método para diferenciar entre criptorquidismo e comportamento masculino na ausência de tecido testicular. Da mesma forma, Memon et al. (2001) e Clement et al. (1998) investigaram o uso do hCG em cães e gatos, respectivamente, como uma ferramenta diagnóstica para avaliar distúrbios da função testicular em animais mais velhos.

Em relação aos garanhões, Bollwein et al. (2008) demonstraram que a administração de hCG resultou em um aumento no fluxo sanguíneo testicular, associado a um aumento na concentração de testosterona e na concentração total de estrógeno. Esses achados sugerem que o hCG pode desempenhar um papel importante na regulação do sistema reprodutivo em garanhões, afetando a função testicular e a produção hormonal.

O uso do hCG em touros tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores ao longo dos anos. Pesquisas conduzidas por Peres et al. (2015) exploraram os efeitos do hCG na qualidade espermática em touros Nelore. Os resultados indicaram que a administração de hCG promoveu melhorias na motilidade e concentração dos espermatozoides, o que pode ter impacto direto na fertilidade e no desempenho reprodutivo desses animais.

Em humanos, Zucker et al. (2022) comprovaram que a monoterapia com hCG melhorou os sintomas do hipogonadismo sem os efeitos colaterais indesejáveis do hCG (ginecomastia, dor de cabeça e queixas gastrointestinais) ou testosterona exógena (policitemia ou eventos tromboembólicos).

2.4 Perímetro escrotal e produção espermática

Estudos conduzidos por Berndtson e Igboeli (1989) e Moura e Erickson (1997) revelaram correlações significativas entre o tamanho dos testículos, o número de células de Sertoli e germinativas e a produção diária de espermatozoides em touros da espécie *Bos taurus*. Essas pesquisas evidenciaram que touros com testículos maiores apresentam uma maior quantidade de espermátides e espermatogônias A1, além de um

maior número de espermátides redondas gerados por cada espermatogônia AI. Isso sugere que o tamanho dos testículos está diretamente relacionado à capacidade de produção de espermatozoides e, por consequência, à qualidade espermática.

2.5 Avaliação Andrológica

A avaliação andrológica tem como objetivo analisar a capacidade reprodutiva de um macho destinado à reprodução, levando em consideração sua condição de saúde geral, saúde genética e saúde do sistema genital. Essa avaliação visa avaliar tanto a capacidade de copular (*potência coeundi*) quanto a capacidade de gerar descendentes (*potência generandi*) (CBRA, 2013).

Durante o exame andrológico, o primeiro passo é a identificação precisa do animal, incluindo informações como raça, idade, nome, número de registro e origem do touro. Em seguida, é essencial realizar uma anamnese detalhada e obter informações sobre o histórico do animal. Após isso, é necessário realizar uma avaliação clínica completa do animal, abrangendo o exame do sistema respiratório, circulatório, digestório, tegumentar, locomotor, escore corporal, possíveis defeitos genéticos, e outros aspectos relevantes. É fundamental inspecionar também o sistema genital, começando pela avaliação do cordão espermático, escroto e testículos. Nos testículos, é importante observar cuidadosamente a simetria, forma, consistência, posição, motilidade e sensibilidade. Além disso, é necessário examinar a cabeça, corpo e cauda do epidídimo. O prepúcio também deve ser analisado, considerando seu tamanho e forma, e realizando uma inspeção minuciosa do óstio, pênis e genitália interna (CBRA, 2013).

Existem diferentes métodos utilizados para a coleta de sêmen durante a avaliação andrológica, tais como o uso de vagina artificial, eletroejaculação e massagem retal das glândulas vesiculares e ampolas dos ductos deferentes (CBRA, 2013). No método da eletroejaculação, a contração dos músculos uretrais é estimulada por meio de pulsos de baixa potência, resultando na liberação do sêmen e do plasma seminal. Durante a coleta, são aplicados estímulos com intervalos de 2 a 3 segundos e uma frequência de 5 a 10 estimulações. À medida que o animal começa a liberar o pré-ejaculado, estímulos mais intensos e prolongados são aplicados. O ejaculado é então coletado em tubos graduados previamente aquecidos a 38°C, permitindo a análise das características físicas do sêmen (HAFEZ, 2004).

Durante a avaliação do sêmen, são analisadas diversas características físicas, como volume, cor, aspecto, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e características morfológicas dos espermatozoides. O volume é medido em mililitros e pode variar consideravelmente entre espécies e métodos de coleta. O turbilhonamento é expresso em uma escala de 1 a 5, indicando a presença e intensidade das ondas de movimento dos espermatozoides, sendo que a nota 1 representa poucas e lentas ondas, e a nota 5 representa um máximo de ondas em quantidade e intensidade. A motilidade é avaliada em um microscópio binocular com lâmina aquecida a 37°C, sendo que para touros, a motilidade mínima deve ser de 70%. O vigor refere-se à intensidade do movimento dos espermatozoides e é avaliado em uma escala de 1 a 5. A concentração é determinada utilizando a Câmara de Neubauer, com uma amostra de 0,02 ml de sêmen diluída em 2 ml de solução de formol-salina-tamponada. A concentração mínima de espermatozoides por ml de sêmen em touros é de pelo menos um milhão (CBRA, 2013).

Na avaliação das características morfológicas, utiliza-se uma lâmina corada com os métodos como Williams, Rosa Bengala e Cherovsky (Vermelho-congo), etc, analisando em um microscópio convencional de luz brilhante no aumento de 1000 vezes. São observados e classificados as anormalidades das células em relação ao tamanho e estrutura, esses defeitos são divididos em maiores de forma (subdesenvolvidos, cabeça isolada patológica, estreito da base, piriforme, pequeno anormal, contorno anormal e formas teratológicas), menores de forma (cabeça delgada, pequeno normal, gigantes, curtos, largos, abaxial, retroaxial e oblíquo), maiores de estrutura (defeito de acrossoma, gota citoplasmática proximal, *pouch formation*, *corkscrew*, pseudogota, outros defeitos de peça intermediária, cauda fortemente dobrada ou enrolada) e menores de estrutura (acrossoma desprendido, gota citoplasmática distal, cauda dobrada, cauda enrolada, cabeça isolada normal) (CBRA, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e local de execução

Foram utilizados 20 touros da raça Nelore de 14 a 16 meses de idade que estavam alojados em uma fazenda particular, localizada no município de Uberaba/MG, onde foram realizadas todas as atividades de análises clínicas, coletas do sêmen e de sangue

dos animais (Figura 1). As análises de sêmen foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia.



Figura 1. Mesa de trabalho com as amostras.

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos e receberam os seguintes tratamentos:

- 1) G1- controle (não recebeu nenhum tipo de tratamento)
- 2) G2- 2500 UI de hCG IM a cada 7 dias por 28 dias

Todos os animais foram submetidos a avaliações clínicas durante cada atividade experimental, bem como 30 dias após o término das aplicações de hCG.

Durante cada análise, todos os animais foram submetidos à pesagem em uma balança comercial e passaram por uma avaliação clínica, abrangendo tanto aspectos gerais como do sistema reprodutivo. Foi realizada a mensuração da circunferência escrotal (Figura 2) utilizando uma fita métrica, além da avaliação da consistência e simetria dos testículos e epidídimos.



Figura 2. Mensuração da circunferência escrotal.

Durante todo o período da pesquisa, todos os animais ficaram submetidos ao mesmo regime de manejo e alimentação. Além disso, ficaram mantidos em pastagem de alta qualidade, recebendo uma suplementação proteico-energética adequada e uma mineralização balanceada, garantindo que mantenham uma condição corporal entre 3 e 4 (NRC, 1996).

3.3 Coleta, preparação e análise das amostras

As amostras de sêmen foram coletadas de todos os animais no mesmo dia pelo método de eletroejaculação (Figura 3) e mantendo as condições técnicas e de assepsia. Todo o material foi aquecido a 37°C e, após a limpeza do prepúcio, o sêmen foi recolhido após a eliminação da primeira porção líquida de plasma seminal. Foi coletado todo o sêmen produzido pelo animal. Logo após a coleta, duas alíquotas do sêmen foram transportadas ao laboratório em solução de formol salina tamponada para posterior análise de morfologia espermática CBRA (2013).

As amostras de sêmen foram analisadas física e morfológicamente de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Parte da análise foi realizada no campo logo após a coleta, enquanto a outra parte foi feita em laboratório.

A avaliação das características físicas de motilidade e vigor foi conduzida por microscopia óptica, pelo mesmo técnico, utilizando uma gota de sêmen em uma lâmina de vidro coberta com lamínula aquecida a 36°C.

Para a avaliação das características morfológicas dos espermatozoides, foi utilizado o método de preparação em câmara úmida, sob microscopia óptica de contraste de fase. Foram avaliadas 200 células, verificando a porcentagem de anormalidades individuais e contabilizando os defeitos maiores, menores e totais. Além disso, foram feitos esfregaços de sêmen corados com vermelho congo para comparação e captura de imagens.

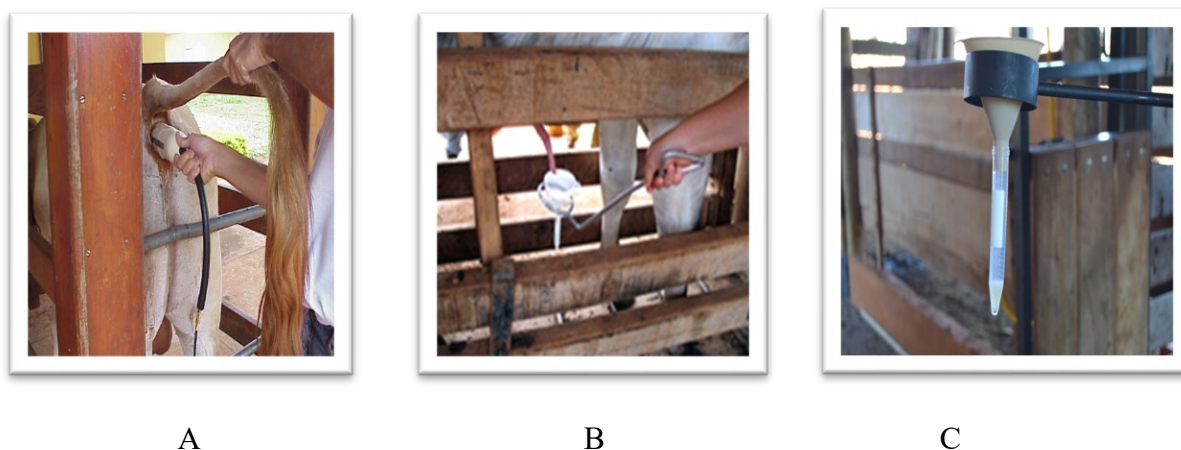


Figura 3. Coleta de sêmen pelo método de eletroejaculação. (A) introdução do eletrodo no animal, (B) coleta do sêmen e (C) sêmen coletado

3.4 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada considerando as seguintes variáveis: perímetro escrotal e características do sêmen (motilidade, vigor, concentração e espermatozoides). As diferenças entre tratamentos foram verificadas por meio do teste de Tukey. Para tratamentos que passaram no pressuposto, foram feitas análises paramétricas (variância). Já os outros, foram não paramétricos sendo o teste de Kruskal para comparar os grupos tratados e não tratados e o teste de Friedman para comparar as coletas. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD). Foi considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao perímetro escrotal, as médias foram estatisticamente iguais em comparação entre os grupos tratados com hCG e controle (tabela 1).

Tabela 1. Médias (\pm SD) de perímetro escrotal dos animais da raça Nelore dos 450 aos 515 dias de idade.

Grupo	Perímetro escrotal (cm)
Tratado com hCG	$34,95 \pm 2,10^a$
Controle	$34,83 \pm 2,26^a$

Letras diferentes entre as colunas mostram diferenças significativas.

O teste de Tukey mostrou diferença significativa do perímetro escrotal entre as coletas, com maior valor de perímetro na última coleta (tabela 2 e figura 4).

Tabela 2. Médias (\pm SD) de perímetro escrotal dos animais da raça Nelore de acordo com a idade e coleta.

Coletas	Idade (dias)	Perímetro escrotal (cm)
Coleta 1	450	$34,07^d \pm 2,30$
Coleta 2	457	$34,17^d \pm 2,2$
Coleta 3	464	$34,65^{cd} \pm 2,26$
Coleta 4	471	$34,85^{cd} \pm 1,96$
Coleta 5	478	$35,07^c \pm 1,83$
Coleta 6	515	$36,52^b \pm 1,74$

Letras diferentes entre as colunas mostram diferenças significativas.

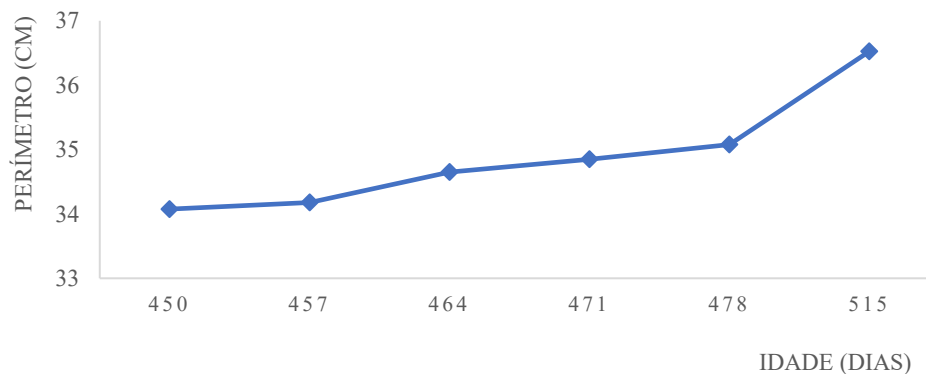


Figura 4. Perímetro escrotal em relação à idade dos animais da raça Nelore.

Não foi observada diferença significativa no perímetro escrotal entre os animais tratados e o grupo controle. Uma possível explicação para esse resultado pode estar relacionada à dose utilizada no tratamento, que pode não ter sido suficiente para promover alterações no perímetro escrotal. Em alpacas, El Zawam et al. (2020), demonstrou uma correlação positiva entre a administração de hCG e o aumento do peso testicular quando utilizou uma dose única de 3.000 UI por via intravenosa.

Um aumento progressivo no perímetro escrotal ao longo da análise foi observado nos animais, o que era esperado devido ao aumento de idade dos animais em cada coleta, o mesmo observado por Pereira et al. (2000) que encontraram uma correlação positiva entre o perímetro escrotal e a idade. Essa relação poderia ser atribuída ao aumento da produção de testosterona, que estimula o crescimento dos tecidos escrotais, resultando no aumento do perímetro escrotal.

A análise de vigor e motilidade espermática foi realizada por meio do teste de Kruskal, o qual revelou diferenças significativas entre os grupos que receberam hCG e o grupo controle (tabela 3). Observamos que os animais tratados apresentaram motilidade e vigor espermático menores em comparação com os animais do grupo controle.

Tabela 3. Médias (\pm SD) de vigor e motilidade espermática dos animais da raça Nelore dos 450 aos 515 dias de idade.

Grupo	Motilidade (%)	Vigor (1-5)
Tratado com hCG	52,60 \pm 22,02 ^f	2,85 \pm 0,82 ^h
Controle	62,90 \pm 16,32 ^e	3,12 \pm 0,74 ^g

Letras diferentes entre as colunas mostram diferenças significativas.

O teste de Friedman mostrou uma diferença significativa de vigor e motilidade espermática entre as coletas (tabela 4, figuras 5 e 6), onde a quinta coleta teve o maior valor de motilidade e na última coleta o maior valor de vigor.

Tabela 4. Médias (\pm SD) de vigor e motilidade espermática dos animais da raça Nelore de acordo com a idade e coleta.

Coletas	Idade (dias)	Motilidade (%)	Vigor
Coleta 1	450	49,2 ^j \pm 21,16	2,80 ^{kl} \pm 0,83
Coleta 2	457	58,94 ^{ij} \pm 20,78	2,57 ^l \pm 0,60
Coleta 3	464	56,00 ^{ij} \pm 21,67	2,50 ^l \pm 0,60
Coleta 4	471	-	-
Coleta 5	478	66,25 ⁱ \pm 20,83	3,40 ^k \pm 0,59
Coleta 6	515	58,94 ^{ij} \pm 10,48	3,68 ^k \pm 0,58

- Coleta 4 = parcela perdida. Letras diferentes entre as colunas mostram diferenças significativas.

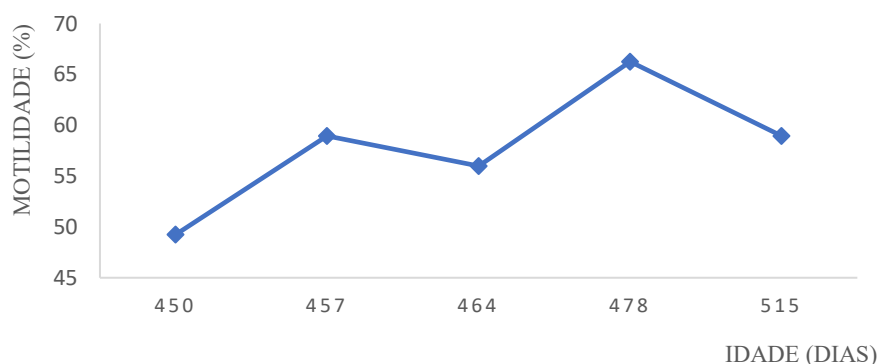


Figura 5. Médias de motilidade do sêmen em relação à idade em cada coleta nos animais da raça Nelore.

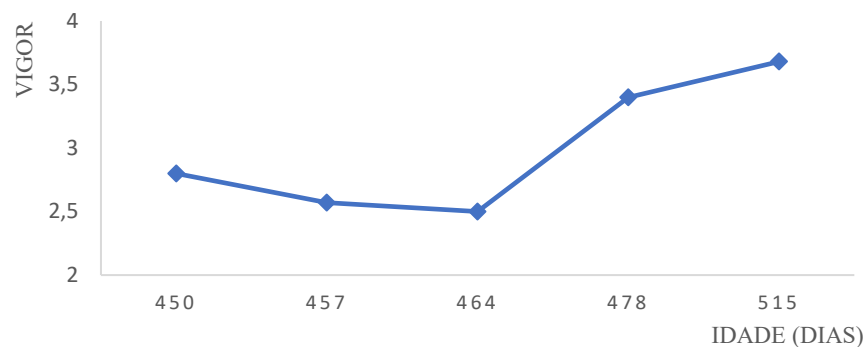


Figura 6. Médias de vigor do sêmen em relação à idade em cada coleta nos animais da raça Nelore.

Uma possível explicação para vigor e a motilidade espermática terem sido menores nos grupos tratados pode estar relacionada à duração do tratamento com hCG, pois Rangraz et al. (2016) demonstrou que a administração de hCG (500 UI) a cada sete dias, por um período de nove semanas, em carneiros, resultou em aumento nos níveis de testosterona no plasma seminal e soro, além de um aumento significativo no volume do sêmen, motilidade progressiva, viabilidade e concentração de espermatozoides. No entanto, um estudo conduzido por Morais et al. (2020) constatou que a administração de uma única dose de 5000 UI de hCG em garanhões da raça Mangalarga Marchador não apresentou diferenças significativas em relação à motilidade, vigor e concentração do sêmen.

Além disso, observou-se diferenças na motilidade e vigor entre as coletas, porém, não foi identificada uma linearidade. Essa variação pode ser efeito de estacionalidade seja ela representada pela temperatura, nutrição ou umidade relativa (Dede et al. 1983, Silva et al. 1987). Também a urina, tubos coletores contaminados, pH e relações iônicas do diluidor, calor, frio, além de problemas a nível testicular e outras doenças podem diminuir a motilidade ou até provocar a mortalidade completa das células (Ball et al. 1983).

Em relação à morfologia espermática (defeitos totais, menores e maiores), as médias desses fatores são estatisticamente iguais em comparação entre os grupos tratados com hCG e grupo controle (tabela 5).

Tabela 5. Médias (\pm SD) da morfologia espermática nos animais da raça Nelore dos 450 aos 515 dias de idade.

Grupo	Defeitos totais	Defeitos maiores	Defeitos menores
Tratado com hCG	33,76 \pm 14,69 ^m	14,12 \pm 11,13 ⁿ	19,63 \pm 8,42 ^o
Controle	37,82 \pm 14,47 ^m	16,12 \pm 9,96 ⁿ	21,7 \pm 11,44 ^o

Letras diferentes entre as colunas mostram diferenças significativas.

A não diferença significativas na morfologia espermática (defeitos maiores, menores e totais) entre o grupo tratado com hCG e o grupo controle poderia ser atribuído ao fato de que o experimento teve uma duração relativamente curta, de apenas 60 dias, enquanto a espermatogênese em bovinos tem um período médio de cerca de 61 dias, além ainda do tempo gasto com a maturação epididimária. Portanto, seria necessário um tempo maior para se observarem mudanças significativas na morfologia espermática. Há poucos relatos na literatura sobre o assunto relacionando hCG com anormalidades espermáticas.

O Teste de Tukey mostrou diferença significativa dos defeitos totais entre as coletas 2 e 5, com menor valor de defeitos verificado na quinta coleta (tabela 6 e figura 7).

Tabela 6. Médias (\pm SD) da morfologia espermática nos animais da raça Nelore dos 450 aos 515 dias de idade de acordo com a coleta.

COLETAS	IDADE (DIAS)	TOTAL DE DEFEITOS (%)
Coleta 1	450	40,20 ^{pq} \pm 16,87
Coleta 2	457	43,00 ^p \pm 14,90
Coleta 3	464	35,50 ^{pq} \pm 15,00
Coleta 4	471	-
Coleta 5	478	28,73 ^q \pm 11,18
Coleta 6	515	31,63 ^{pq} \pm 10,56

- Coleta 4 = parcela perdida. Letras diferentes entre as colunas mostram diferenças significativas.

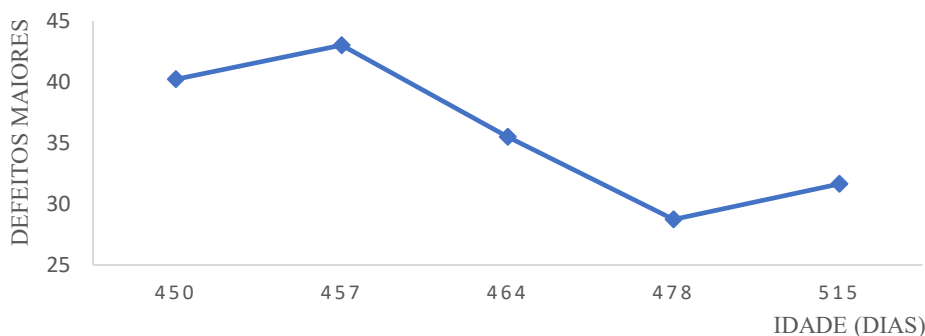


Figura 7 – Médias de total de anormalidades espermáticas em relação à idade em cada coleta nos animais da raça Nelore.

A variação dos defeitos totais ao longo das coletas não segue uma linearidade, uma vez que os animais estão na fase de puberdade e as características dos ejaculados na fase puberal apresentam uma grande variabilidade tanto qualitativa quanto quantitativa (Wolf et al., 1965). Somente na quinta coleta, foi observado um total de 28,73% de defeitos totais, enquanto nas outras quatro coletas este valor foi superior a 30%, estando fora dos padrões (CBRA, 2013). Essa tendência é comum em touros em fase de desenvolvimento puberal, semelhante ao relatado em outros estudos, tanto com raças taurinas quanto zebuínas (Wolf et al., 1965; Lunstra et al., 1978; Freneau, 1991; Brito et al., 2004).

O teste de Friedman mostrou diferença significativa dos defeitos maiores e menores entre as coletas, sendo que na última coleta obteve-se a menor quantidade de defeitos maiores e na quinta coleta para os defeitos menores (tabela 7, figura 8 e 9).

Tabela 7. Médias (\pm SD) de defeitos espermáticos maiores e menores nos animais da raça Nelore de acordo com a idade e coleta.

Coletas	Idade (dias)	Defeitos maiores (%)	Defeitos Menores (%)
Coleta 1	450	18,00 ^{rs} \pm 11,22	22,22 ^t \pm 9,79
Coleta 2	457	18,73 ^r \pm 11,85	24,26 ^t \pm 12,19
Coleta 3	464	17,05 ^{rs} \pm 8,94	23,45 ^t \pm 9,60
Coleta 4	471	-	-
Coleta 5	478	15,63 ^{rs} \pm 12,16	13,10 ^u \pm 6,83
Coleta 6	515	11,3 ^s \pm 6,19	20,26 ^t \pm 7,99

- Coleta 4 = parcela perdida. Letras diferentes entre as colunas mostram diferenças significativas.

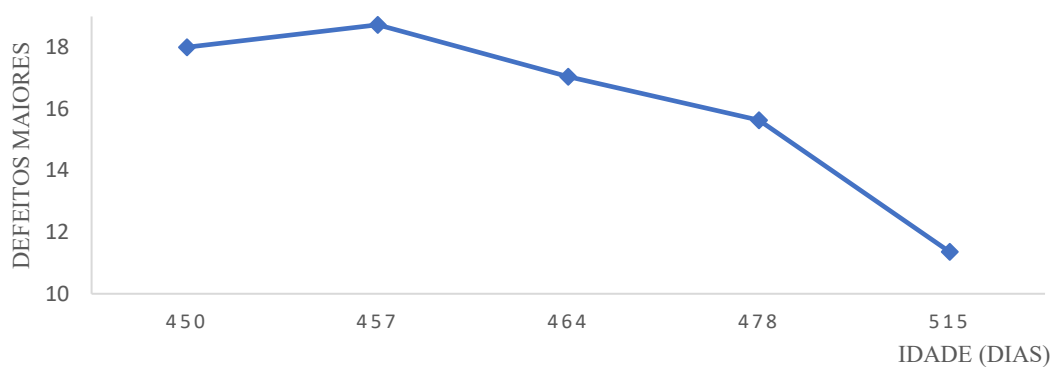


Figura 8. Médias de defeitos maiores em relação à idade em cada coleta nos animais da raça Nelore.

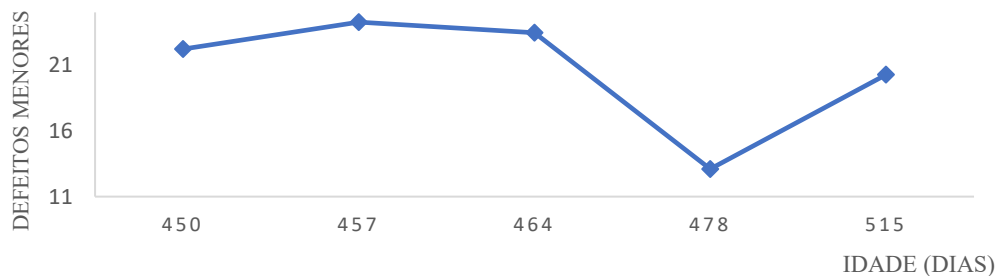


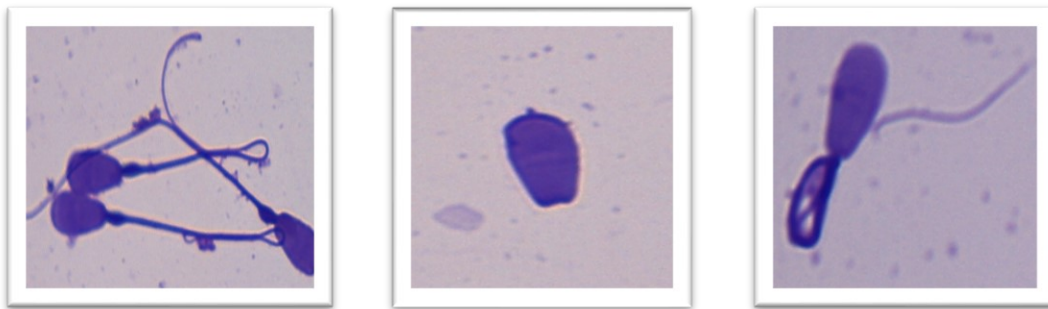
Figura 9. Médias de defeitos menores em relação à idade em cada coleta nos animais da raça Nelore.

Houve um decréscimo linear nos defeitos maiores dos animais estudados e isso seria esperado uma vez que os valores de perímetro escrotal tiveram uma linha crescente entre as coletas. Semelhante ao observado neste estudo, Silva et al. (2002) constatou uma correlação entre circunferência escrotal e anormalidades nos espermatozoides em que quanto maior o perímetro escrotal do animal a tendência seria de menor a ocorrência de defeitos espermáticos.

As porcentagens de defeitos menores foram relativamente altas (em torno de 20%) em todas as coletas, com exceção da quinta, o que pode ser interpretado como um indicativo de que os animais ainda não atingiram a maturidade epididimária necessária para apresentar uma redução significativa desses defeitos, pois segundo Lunstra e Echternkamp (1978) e Garcia et al. (1987), a maturidade sexual é caracterizada por uma morfologia espermática com no máximo 10% de defeitos espermáticos maiores e 20% de defeitos espermáticos menores.

Na quinta coleta ocorreu uma diminuição brusca e inesperada no número de patologias. Existem várias possibilidades que podem explicar esse fenômeno, incluindo fatores climáticos e/ou relacionados ao próprio animal, porém neste estudo não conseguimos identificar o motivo desta redução.

Os defeitos espermáticos mais observados (figura 10), em ordem crescente foram: cauda dobrada (27%), gota citoplasmática proximal (24%) cauda fortemente enrolada ou dobrada (17%) e cabeça isolada normal (14%). Lunstra et al. (1978) também relataram altas incidências de patologias espermáticas em ejaculados de animais púberes, com destaque para a presença de gota citoplasmática proximal, cauda dobrada e anomalias de cabeça em animais das raças Hereford, Red Angus, Red Poll e Brown Swiss.



A

B

C

Figura 10. Anormalidades dos espermatozoides nos touros da raça Nelore. (A) gota citoplasmática proximal, (B) cabeça isolada normal e (C) cauda fortemente dobrada ou enrolada.

5 CONCLUSÃO

A utilização de hCG em machos da raça Nelore de 14 a 16 meses não demonstrou, nesta pesquisa, eficácia em antecipar a maturidade sexual. Novos estudos são necessários com aplicações de hCG por períodos mais prolongados para melhor compreensão do seu efeito na qualidade espermática e maturação sexual em bovinos.

Referências

AGUIAR, G. V.; ARAÚJO, A. A.; MOURA, A. DE A. A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 35 (4): 1629–1638, 2006.

APONTE, P.M.; ROOIJ, D.G.; BASTIDAS, P. Testicular development in Brahman bulls. **Theriogenology**, 64 (6): 1440-1455, 2005.

ARIGHI M.; BOSU W.T.K. Comparison of hormonal methods for diagnosis of cryptorchidism in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, 9:20–6, 1989.

BALL, L.; OTT, R.S.; MORTIMER, E.C.; SIMONS, J. C. Manual for breeding soundness examination of bulls. **Theriogenology**, 12:1-65, 1983.

BARTH, A.D.; OMINSKI, K.H. Reproductive performance of beef cattle: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, 80 (3): 403-410, 2000.

BRITO, L. F. Sexual development in early and latematuring *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, 62: 1198–1217, 2004.

BARTKE, A.; VOGLMAYR, J. F. Effects of gonadotropins on androgen levels in rete testis fluid of the ram. **Biology of reproduction**, 16 (2): 274–280, 1977.

BERNDTSON, W. E.; IGBOELI G. Testis size, spermatogenesis and semen characteristics in Aberdeen-Angus, Charolais and white Fulani bulls. **Journal of Animal Science**, 67 (11): 2975-2981, 1989.

BOLLWEIN, H.; SCHULZE, J.J.; MIYAMOTO, A.; SIEME, H. Testicular Blood Flow and Plasma Concentrations of Testosterone and Total Estrogen in the Stallion after the Administration of Human Chorionic Gonadotropin. **Journal of Reproduction and Development**, 54 (5): 335-339, 2008.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 3. Ed. – Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

CHENOWETH, P.J. Reproductive selection of males: current and future perspectives. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, 35 (2): 133-138, 2011.

CHRISTIANSEN, P.; ANDERSSON, A.M.; SKAKKEBAEK, N.E.; JUUL, A. Serum inhibin B, FSH, LH and testosterone levels before and after human chorionic gonadotropin stimulation in prepubertal boys with cryptorchidism. **European Journal Of Endocrinology**, 147, (1): 95-101, 2002.

CLEMENT, F.; PLONGERE, G.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Assessment of the sexual function in the stallion. **Point Veterinaire**, 29: 61–66, 1998.

COSTA e SILVA, E.V.; FERREIRA, B.X.; QUEIROZ, V.L.D.; FILHO, L.C.C.; ZÚCARRI, C.E.S.N. Precocidade sexual de touros a campo em condições tropicais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 37, (2): 97-104, 2013.

DEDE, T. I.; AKPOKODJE, J.U.; ODITI, P. I. Seminal characteristics and libido of Holtstein/Friesien bulls raised in a tropical environment. **Trop. Vet.**, 1: 77-84, 1983.

FIELDS, M.J.; FHENTGES, J.R.; CORNELISS, K.W. Aspect of the sexual development of Brahman versus Angus bulls in Florida. **Theriogenology**, 18 (1): 17-31, 1982.

FONSECA, V.O., VALE FILHO, V.R., MIES FILHO, A. ABREU, J.J. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 79 p, 1992.

FRENEAU, G.E. Desenvolvimento reprodutivo em tourinhos holandeses e mestiços holandês gir, desde os seis até os 21 meses de idade (Puberdade e pós-puberdade). 254f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - **Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais**, 1991.

GARCIA, J.M.; PINHEIRO, L.E.L.; OKUDA, H.T. Body development and semen physical and morphological characteristics of young Guzerá bulls. **Ars Veterinária**, 3: 47-53, 1987.

HAFEZ, B.; Hafez, E. S. E. **Reprodução Animal**, 7ª Ed., Barueri, SP: Manole 2004, p. 501.

KALTENBACH, C.C., DUMN, T.G. Endocrinology of reproduction. In: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animals**, p. 1-23, 1980.

KAWAKAMI, E.; HORI, T.; TSUTSUI, T. Changes in plasma LH and testosterone levels and semen quality after a single injection of hCG in two dogs with spermatogenic dysfunction. **The Journal of veterinary medical science**, 60 (6): 765–767, 1998.

LOPEZ, G.H.; FERNANDEZ, H.B.; PERES, L.C.; BEZERRA, L.A.F. Age at first calving and its relationship with productive and reproductive performance in Nellore cows raised extensively. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 35(3): 1067-1072, 2006.

LUNSTRA, D. D. Puberty in beef bulls: hormone concentrations, sexual development, sperm production and sexual behavior. **Journal of Animal Science**, 54(5), 1058-1068, 1982.

LUNSTRA, D.D.; FORD, J.J.; ECHTERKAMP, S.E. Puberty in beef bulls: Hormone concentration, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. **Journal of Animal Science**, 46: 1054-1062, 1978.

LUNSTRA, D.D.; GREGORY, K.E.; CUNDIFF, L.V. Heritability estimates and adjustment factors for the effects of bull age of dam on yearling testicular size in breeds of bulls. **Theriogenology**, 30: 127-136, 1988.

MARTIN-du PAN, R.C.; CAMPANA, A. Physiopathology of spermatogenic arrest. **Fertility and Sterility**, 60 (6): 937-946, 1993.

MEMON, M.A.; GANJAM, V.K.; PAVLETIC, M.M.; SCHELLING, S.H. Use of human chorionic gonadotropin stimulation test to detect a retained testis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 201 (10): 1602, 1992.

MEMO, M.A.; TIBARY A. Canine and feline cryptorchidism. Em: **Recent Advances in Small Animal Reproduction**, [s.l: s.n.], 2001.

MOURA, A. A., ERICKSON, B. H. Spermatogenesis in *Bos indicus* x *Bos taurus* and *Bos taurus* bulls at different stages of postnatal development. **Theriogenology**, 47(6), 1235-1250, 1997.

MORAIS, R.C.L.; DUTRA, G.A. OLIVEIRA, J.P.; FONSECA, F.C.V.L.; CARVALHO, C.F.P.M.; JACOB, J.C.F.; Ultrassonografia testicular no modo color Doppler espectral e avaliação andrológica de garanhões tratados com gonadotrofina coriônica humana (hCG) em diferentes estações do ano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 72, (4): 1137–1144, jul. 2020.

NOGUEIRA, G.P.; WILDEUS, S.; HOLROYD, R.G.; ENTWISTLE, K.W. Patterns of puberal development in Sahiwal and Brahman cross bulls in tropical Australia. I. Growth and semen characteristics. **South American *Bos indicus* (Zebu) cattle**, 22: 361–373, 1984.

PEREIRA, E.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Correlação genética entre perímetro escrotal e algumas características reprodutivas na raça Nelore. **Revista Brasileira De Zootecnia**, 29(6), 1676–1683, 2000.

PERES, R. F. G. Effects of human chorionic gonadotropin on semen quality in Nelore bulls. **Semina: Ciências Agrárias**, 36(4): 2371-2382, 2015.

PINEDA, M.H. Impacto de la precocidad sexual en la rentabilidad de hatos de doble propósito. **Revista Científica**, 12(2): 161-166, 2002.

QUIRINO, C.; BERGMANN, J.; BERGMANN, J.A.G. Heritability of scrotal circumference adjusted and unadjusted for body weight in nellore bulls, using univariate and bivariate animal models. **Theriogenology**, 49, (7): 1389-1396, 1998.

RANGRAZ, H., MOGADAM, G., DAGIG K, H., RAFAT, S. The effect of hCG injection on serum and seminal plasma testosterone in Ghezel ram. **Journal of Animal Science Research**, 26 (2): 131-139, 2016.

RAWLINGS, N. C. A review of spermatogenesis, semen formation and in vitro methods to assess semen quality in bovines. **Animal Reproduction Science**, 105, (1–2): 1-24, 2008.

ROHAYEM, J.; ZITZMANN, M.; LAURENTINO, S.; KLIESCH, S.; NIESCHLIG, E.; HOLTERHUS, P.M.; KULLE, A. The role of gonadotropins in testicular and adrenal androgen biosynthesis pathways—Insights from males with congenital hypogonadotropic hypogonadism on hCG/rFSH and on testosterone replacement. **Clinical Endocrinology**, 94, (1): 90-101, 2020.

SANTOS, V.G., COSTA, E.P., BEZERRA, L.A.F., SOUZA, B.B., GAMA, L.T. Libido and mating behavior of Nellore bulls under different breeding systems. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 34 (6): 2233-2240, 2005.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. **The physiology of reproduction**, 1 (2): 1364-1434, 1994.

SHORE, L.; YEHUDA, R.; MARCUS, S.; BARTOEV, B.; SHEMESH, M. Effect of hCG injection on prostaglandin E concentrations in ram seminal plasma. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, 70 (3-4): 291-301, 2003.

SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. N.; PORTO, J. A. Efeito da estacionalidade nas características testiculares espermáticas de touros Nelore e mestiços. Resumos. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1987. p. 55.

SILVA, A.M. Correlações genéticas entre características produtivas e de qualidade do sêmen de touros Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31 (5): 1971-1977, 2002.

SUNDBY, A.; TOLLMAN, R.; VELLE, W. Long-term effect of hCG on plasma testosterone in bulls. **Journal Reproduction Fertility**, 45 (2): 249-254, 1975.

SUNDBY, A.; VELLE, W. Relationship between Growth Rate in Bulls and Human Chorionic Gonadotropin-Induced Plasma Testosterone Concentrations. **Journal of Animal Science**, 56 (1): 52-57, 1983.

SUNDBY, P. M., ROSNER, W., HSUEH, A. J., PARDRIDGE, W. M. The role of luteinizing hormone in the regulation of testicular function. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 41(3): 555-564, 1975.

VÁSQUEZ, L.; VERA, O.; ARANGO, J. Testicular growth and semen quality in peripuberty Brahman bulls. **Livestock Research for Rural Development**, 15 (10), 2003.

WOLF, F.R.; ALMQUIST, J.O.; HALE, E.B. Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**, 24: 761-765, 1965.

ZAWAM, A.; TIBARY, A.; PATINO, C. Basal Levels and hCG Responses of Serum Testosterone and Estrogen in Male Alpacas. **Frontiers in Veterinary Science**. Nov 12 (7), 2020.

ZUCKER, I.; RAINER, Q.; PAI, R.K.; MASTERSON, T.A. Efficacy and Safety of Human Chorionic Gonadotropin Monotherapy for Men With Hypogonadal Symptoms and Normal Testosterone. **Cureus**, 14 (5): 25543, 2022.