

# INDUÇÃO DA OVULAÇÃO E CARACTERÍSTICAS OVARIANAS DE MARRÃS PRÉ-PÚBERES TRATADAS COM GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA OU KISSPEPTINA<sup>1</sup>

FABIO LUIS NOGUEIRA NATAL<sup>2</sup>, ALFREDO JOSÉ FERREIRA DE MELO<sup>2</sup>, DIEGO LOBON JIMENEZ FILHO<sup>3</sup>, KEILA MARIA RONCATO DUARTE<sup>4</sup>, RAFAEL HERRERA ALVAREZ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 14/09/2015. Aceito para publicação em 11/02/2016.

<sup>2</sup>Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Centro Sul, Piracicaba, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, SP, Brasil.

\*Autor correspondente: rherrera@apta.sp.gov.br

RESUMO: Devido à semelhança na estrutura e função com o hormônio luteinizante (LH), a gonadotrofina coriônica humana (hCG) tem sido convencionalmente o principal hormônio utilizado para induzir o estro e a ovulação nas fêmeas suínas. Recentemente, foi demonstrado que o neuropeptídeo kisspeptina é o precursor da descarga de LH em diferentes espécies de mamíferos, incluindo a suína. Dessa forma, o presente estudo objetivou determinar se uma das formas dessa substância (kisspeptina-10) associada à gonadotrofina coriônica equina (eCG) pode ser um método eficiente para induzir a ovulação de marrãs pré-púberes. Trinta marrãs de 5 meses de idade, com peso médio de  $78,0 \pm 8,4$  kg, foram distribuídas aleatoriamente em cinco grupos de seis animais cada. Os grupos 1, 2 e 3 receberam 750 UI de eCG, enquanto que os grupos 4 e 5 receberam solução fisiológica. Setenta e duas horas após, o grupo 2 recebeu 380 nmol de kisspeptina-10, os grupos 3 e 4 receberam 500 UI de hCG e os grupos 1 e 5 receberam solução fisiológica. As injeções foram aplicadas em dose única, utilizando a via intramuscular. Os animais foram abatidos sete dias após e a ovulação foi constatada pela presença de corpos lúteos nos ovários recuperados. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e teste exato de Fisher. O número de fêmeas que ovulou foi semelhante nos grupos 2 e 3. Essa resposta foi superior ao grupo 5 ( $P < 0,01$ ) e aos grupos 1 e 4 ( $P = 0,08$ ). O peso e o tamanho dos ovários não foram influenciados pelos tratamentos, enquanto que o número de ovulações foi maior para os grupos 2 e 3 ( $P < 0,01$ ). Esses resultados sugerem que a kisspeptina-10 tem atividade biológica comparável à hCG para induzir a ovulação de marrãs pré-púberes.

Palavras-chave: eCG, hCG, kiss-10, ovulação, puberdade, suínos.

## INDUCTION OF OVULATION AND OVARIAN CHARACTERISTICS OF PREPUBERTAL GILTS TREATED WITH HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN OR KISSPEPTIN

ABSTRACT: In view of its similar structure and function to luteinizing hormone (LH), human chorionic gonadotropin (hCG) has conventionally been used as the main hormone to induce estrus and ovulation in sows. Recently, it has been demonstrated that the neuropeptide kisspeptin is associated with pituitary LH release in different mammalian species, including swine. Thus, the aim of this study was to determine whether kisspeptin-10 combined with equine chorionic gonadotropin (eCG) could be an efficient method to induce ovulation in prepubertal gilts. Thirty 5-month-old gilts weighing  $78.0 \pm 8.4$  kg were randomly divided into five groups of six animals each. Groups 1, 2 and 3 received 750 IU eCG, while groups 4 and 5 received saline solution. After

72 hours, the animals received 380 nmol kisspeptin-10 (group 2), 500 IU hCG (groups 3 and 4), or saline (groups 1 and 5). The treatments were applied by a single intramuscular injection. The animals were slaughtered 7 days later and ovulation was confirmed by the presence of corpora lutea in the recovered ovaries. Data were analyzed by the Kruskal-Wallis and Fisher exact tests. The number of gilts that ovulated was similar in groups 2 and 3. This number was higher in group 5 ( $P<0.01$ ) and in groups 1 and 4 ( $P=0.08$ ). The weight or size of the ovaries was not influenced by the treatments, although the number of ovulations was higher in groups 2 and 3 ( $P<0.01$ ). These results suggest that kisspeptin-10 and hCG have similar biological activity to induce ovulation in prepubertal gilts.

Keywords: eCG, hCG, kisspeptin-10, ovulation, puberty, swine.

## INTRODUÇÃO

Um fator importante da eficiência reprodutiva dos rebanhos suínos é a idade com que as fêmeas destinadas à reprodução recebem o primeiro serviço, sendo essa idade, em grande parte, dependente da sua precocidade sexual (KOKETSU, 2007). Dependendo das raças e tipos genéticos, as fêmeas suínas podem atingir a puberdade entre 5 a 9 meses de idade (MARTINAT-BOTTÉ *et al.*, 2011). Reduzir esta variação, por meio do controle do início da puberdade, pode ser extremamente benéfico para a produtividade do rebanho, uma vez que as fêmeas que atingem a puberdade mais cedo tendem a permanecer mais tempo no rebanho e ser mais produtivas (PATTERSON *et al.*, 2010; SAITO *et al.*, 2011). Por esse motivo, nas granjas mais tecnificadas tornou-se prática comum avançar a puberdade das marrãs utilizando terapia hormonal. Basicamente, o tratamento consiste na aplicação inicial de hormônios capazes de estimular o desenvolvimento folicular (eCG ou FSH), seguido da indução da ovulação desses folículos, utilizando hormônios envolvidos direta (LH) ou indiretamente (hCG, GnRH) com esse processo (KNOX *et al.*, 2000). O tratamento mais comumente utilizado, à base de eCG e hCG, resulta na expressão do estro e a ovulação no período de 6 dias em cerca de 90% das fêmeas imaturas tratadas (BARTLETT *et al.*, 2009) e, de forma geral, o ciclo estral subsequente apresenta um padrão de secreção hormonal característico das fêmeas cíclicas (PATERSON e MARTIN, 1981; KARALUS *et al.*, 1990).

Por outro lado, a recente descoberta do peptídeo neural kisspeptina como agente indutor endógeno da secreção de GnRH abriu uma nova era na neuroendocrinologia reprodutiva (de ROUX *et al.*, 2003; MATSUI *et al.*, 2004). Inicialmente, a kisspeptina foi identificada como um fator supressor metastático, pois suprime a metástase

do melanoma e o câncer de mama (KOTANI *et al.*, 2001). Estudos posteriores mostraram que a kisspeptina consistentemente estimula a secreção das gonadotropinas, especificamente LH, em todas as espécies de mamíferos examinadas até agora, apesar que sua eficácia parece depender da espécie, idade, sexo, ambiente hormonal, estação e via de administração (OKAMURA *et al.*, 2013).

A kisspeptina é um produto do gene kiss-1 (KOTANI *et al.*, 2001) e aparece como um pré-pró-hormônio de 145 aminoácidos que, na maioria dos mamíferos, é enzimaticamente processado para produzir a forma biologicamente ativa de 54 aminoácidos (Kp54) que, por sua vez, pode ser clivada em fragmentos de 14, 13 ou 10 aminoácidos (OAKLEY *et al.*, 2009). Estas kisspeptinas mais curtas, particularmente a sequência N-terminal de 10 aminoácidos, são altamente conservadas em mamíferos e, por vezes, mais potentes que o peptídeo original Kp54 (TASSIGNY e COLLEDGE, 2010; MATSUI e ASAMI, 2014).

A administração de kisspeptina em ratas pré-púberes avança o momento da abertura vaginal e impede o atraso da puberdade provocada pela subnutrição (CASTELLANO *et al.*, 2005). Em ovelhas pré-púberes, a administração intermitente de kisspeptina aumenta a secreção de LH para níveis comparáveis aos de fêmeas cíclicas adultas (REDMOND *et al.*, 2011). Da mesma forma, a injeção única de kisspeptina induz uma descarga de LH em porcas e cabras pré-púberes (LENTS *et al.*, 2008; SAITO *et al.*, 2012), sendo que nas cabras essa resposta foi de maior intensidade em comparação aos animais púberes. Em função desses resultados, nossa hipótese é que a injeção de kisspeptina pode ser utilizada para induzir a ovulação de fêmeas suínas pré-púberes previamente estimuladas com eCG. O presente estudo objetivou determinar a eficiência do neuropeptídeo kisspeptina em induzir a ovulação de marrãs pré-púberes previamente tratadas com eCG.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na estação de desempenho de suínos (Piracicaba, SP, Brasil), de setembro de 2012 a fevereiro de 2013. Foram utilizadas leitoas da linhagem Penarlan (macho P76 x fêmea Nãima), com peso inicial aproximado de 30 kg, alojadas em baias individuais localizadas em galpão de 43,5 x 16,50 m, com cobertura em duas águas, telhas de amianto e pé-direito de 3 m. A dieta foi formulada com base nas exigências em nutrientes para a fase de crescimento, de acordo com o NRC (1998).

Ao atingir o peso médio de  $78,0 \pm 8,4$  kg, com idade aproximada de cinco meses, as marrãs foram distribuídas aleatoriamente em cinco grupos de seis animais. Os grupos 1, 2 e 3 receberam 750 UI de eCG (Novormon<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), enquanto que os grupos 4 e 5 receberam solução fisiológica. Setenta e duas horas após, o grupo 1 recebeu solução fisiológica, o grupo 2 recebeu 0,5 mg (380 nmol) de kisspeptina (kisspeptin-10, sequência peptídica YNWNSFGLRF-NH<sub>2</sub>, GenScript, Piscataway, NJ, USA), os grupos 3 e 4 receberam 500 UI de hCG (Chorulon<sup>®</sup>, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e o grupo 5 uma segunda injeção de solução fisiológica. A dose de kisspeptina-10 foi baseada na quantidade mínima necessária para estimular a secreção de LH em porcas imaturas (LENTS *et al.*, 2008). As injeções foram aplicadas em dose única, utilizando a via intramuscular (i.m.) e os animais foram abatidos cinco dias após a segunda injeção (hCG, kisspeptin-10 ou solução fisiológica). Imediatamente após o abate, os ovários foram recuperados para conferir a presença de corpos lúteos (CL), testemunhas da ovulação. Igualmente, os ovários foram pesados e seu tamanho estimado pelo cálculo de seu volume, utilizando a fórmula simplificada da elipse, multiplicando-se o

comprimento x largura x 0,5 x Pi. Para análise, foi considerado o valor médio dos dois ovários (peso, volume e número de CL).

O teste de distribuição de normalidade dos resíduos foi realizado pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis contínuas (peso e volume dos ovários e número de CL) foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis e, quando a diferença foi significativa, as comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o teste Mann-Whitney. As variáveis categóricas (animais que ovularam vs. animais que não ovularam) foram analisadas pelo teste exato de Fisher, considerando nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No grupo 3 um animal que ovulou e apresentou ovários com peso (36,8 g) e volume (20,2 cm<sup>3</sup>) excessivos (Figura 1) foi desconsiderado da análise dessas variáveis. O peso e o tamanho dos ovários não foram influenciados pelos tratamentos (Tabela 1). O número de fêmeas do grupo 3 que ovulou em resposta à injeção de kisspeptina-10 foi significativamente maior que o controle (grupo 5) que recebeu solução fisiológica ( $P < 0,01$ ). O mesmo ocorreu no grupo 2, que recebeu hCG, comprado com o grupo controle. Por sua vez, o número de CL



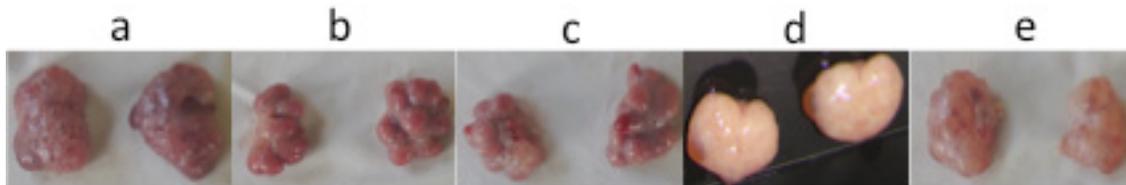
Figura 1. Ovários hiperestimulados apresentando corpos lúteos e folículos anovulatórios císticos de um animal tratado com eCG + hCG.

Tabela 1. Resposta ovulatória e características dos ovários de marrãs pré-púberes submetidas aos diferentes tratamentos

Tratamento <sup>1</sup>	Ovularam (%)	Características dos ovários (média ± epm)		
		volume (cm <sup>3</sup> )	peso (g)	número de CL
Grupo 1	1/6 (16,6) ab	3,7 ± 0,4 a	3,0 ± 0,3 a	0,5 ± 0,5 a
Grupo 2	5/6 (83,3) bc	3,9 ± 0,2 a	4,7 ± 0,6 a	6,0 ± 1,4 b
Grupo 3	5/6 (83,3) bc	4,0 ± 0,4 a	3,3 ± 0,7 a	5,0 ± 1,7 b
Grupo 4	1/6 (33,3) ab	4,9 ± 0,6 a	4,6 ± 0,7 a	2,4 ± 2,3 ab
Grupo 5	0/6 (0,0) a	3,6 ± 0,5 a	3,0 ± 0,4 a	0,0 ± 0,0 a

<sup>1</sup>Grupo 1: eCG + solução fisiológica; Grupo 2: eCG + kiss-10; Grupo 3: sCG + hCG; Grupo 4: solução fisiológica + hCG; Grupo 5: solução fisiológica + solução fisiológica.

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si ( $P < 0,01$ ).



**Figura 2.** Exemplo de resposta ovariana de marrãs pré-púberes tratadas com 750 UI de eCG (a, b, c) ou solução fisiológica (d, e), seguida, após 72 horas, de injeção de solução fisiológica (a), Kisspeptina-10 (b), hCG (c), hCG (d) e solução fisiológica (e). O abate dos animais foi realizado sete dias após a segunda injeção dos tratamentos.

dos animais que ovularam do grupo 2 ( $6,0 \pm 1,0$ ) não foi diferente do grupo 3 ( $5,0 \pm 1,7$ ).

Na Figura 2 está ilustrado um exemplo da resposta dos animais aos diferentes tratamentos. O grupo controle (grupo 5), tratado com solução fisiológica nos dois períodos, apresentou unicamente folículos menores que dois milímetros, sem nenhuma evidência de ovulação. Esses resultados estendem a possibilidade de uso da kisspeptina como um potencial agente farmacológico capaz de induzir a ovulação de marrãs pre-púberes previamente tratadas com eCG. A injeção de eCG, sem posterior injeção de hCG (grupo 1) ou somente hCG, sem estimulação previa com eCG (grupo 4) não resultou em ovulação na maioria dos animais. Contudo, um animal do grupo 1 teve três ovulações (CL) e outro do grupo 4, apresentou uma ovulação (corpo hemorrágico). Essas ovulações, em pequeno número e em somente um dos ovários, podem ser indicativas que alguns animais estavam no início da puberdade com folículos dominantes capazes de ovular espontaneamente (grupo 1) ou em resposta à injeção da hCG (grupo 4).

Um problema comum observado em fêmeas suínas para reposição é sua incapacidade de atingir precocemente a puberdade (MOELLER *et al.*, 2004; SAITO *et al.*, 2011). Nos sistemas de criação de suínos brasileiros, as fêmeas destinadas à reprodução que não conseguem expressar o estro até os 8 meses de idade são frequentemente descartadas do plantel (ENGBLOM *et al.*, 2007; STANCIC *et al.*, 2011). Consequentemente, a administração de kisspeptina poderia acelerar a manifestação do estro e a ovulação nesses animais.

Com relação ao grau de fertilidade da ovulação induzida por kisspeptina e se essa ovulação é acompanhada de ciclos estrais regulares, são questões ainda não elucidadas. Esses dois aspectos são importantes, uma vez que o tratamento com

eCG e hCG em animais pré-púberes resulta em baixa fertilidade do primeiro estro induzido (MARTINAT-BOTTE *et al.*, 2011). Ainda, a ovulação induzida pelo tratamento com hCG geralmente não constitui o início da atividade ovariana cíclica (BARTLETT *et al.*, 2009). Em novilhas pré-púberes, o tratamento com kisspeptina-10 (injeções i.v. de 0,5 µg/kg PV a cada duas horas durante 3 dias) resultou na ovulação, sem continuidade da ciclicidade estral. Após a remoção do tratamento, a secreção de LH e o desenvolvimento folicular retornaram a valores semelhantes aos do grupo controle (ECHEVERRÍA *et al.*, 2014). Ainda neste estudo, a dose e via de aplicação utilizada intramuscular (i.m.) sugere que a quantidade de kisspeptina utilizada (5,4 nmol/kg de peso vivo) foi suficiente para induzir a descarga preovulatória de LH. Em experimento com bezerros machos pré-púberes de 4-6 meses de idade, EZZAT AHMED *et al.* (2009) demonstraram que a injeção de 3,85 nmol/kg de peso vivo de kisspeptina-10 aplicada pelas vias i.m. e i.v. estimulou significativamente a liberação de LH e FSH e, embora a resposta tenha sido superior na via i.v., os autores sugerem que o peptídeo pode sofrer algum tipo de inativação quando administrado pela via im. Dessa forma, são necessários estudos adicionais para evidenciar se o efeito da kisspeptina-10 observado no presente estudo foi transitório, sem repercussão posterior na atividade ovariana das marrãs, bem como ajustar a dose ótima para induzir a ovulação.

## CONCLUSÃO

A kisspeptina-10 possui atividade biológica comparável a gonadotrofina coriônica humana (hCG) para a indução da ovulação em marrãs pré-púberes.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às funcionárias de apoio Maria de Lourdes Oliveira e Isabel Cristina Rovay Manarin pelo auxílio com o cuidado dos animais experimentais.

## REFERÊNCIAS

- BARTLETT, A.; PAIN, S.J.; HUGHES, P.E.; STOTT, P.; VAN WETTERE, W.H.E.J. The effects of PG600 and boar exposure on oestrus detection and potential litter size following mating at either the induced (pubertal) or second oestrus. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.219-227, 2009.
- CASTELLANO, J.M.; NAVARRO, V.M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; NOGUEIRAS, R.; TOVAR, S.; ROA, J.; VAZQUEZ, M.J.; VIGO, E.; CASANUEVA, F.F.; AGUILAR, E.; PINILLA, L.; DIEGUEZ, C.; TENA-SEMPERE, M. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. **Endocrinology**, v.146, p.3917-3925, 2005.
- DE ROUX, N.; GENIN, E.; CAREL, J.C.; MATSUDA, F.; CHAUSSAIN, J.L.; MILGROM, E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.10972-10976, 2003.
- ECHVERRÍA, R.S.; ROBLES, R.C.C.; ÁVILA, H.R.V.; PERERA-MARÍN, G.; ARÉVALO, J.A.A.; NETT, T.M.; AGUILAR, C.G.; VILLA-GODOY, A. Luteinizing hormone and ovarian activity in response to kisspeptin-10 and its association with IGF-1 and leptin in prepubertal heifers. **Revista Mexicana de Ciencia Pecuaria**, v.5, p.181-200, 2014.
- ENGBLOM, L.; LUNDEHEIM, N.; DALIN, A.; ANDERSSON, K. Sow removal in Swedish commercial herds. **Livestock Science**, v.106, p.76-86, 2007.
- EZZAT AHMED, A.; SAITO, H.; SAWADA, T.; YAEGASHI, T.; YAMASHITA, T.; HIRATA, T.; SAWAI, K.; HASHIZUME, T. Characteristics of the stimulatory effect of kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 55, p.650-654, 2009.
- KARALUS, U.; DOWNEY, B.R.; AINSWORTH, L. Maintenance of ovulatory cycles and pregnancy in prepubertal gilts treated with PMSG and hCG. **Animal Reproduction Science**, v.22, p.235-241, 1990.
- KNOX, R.V.; TUDOR, K.W.; RODRIGUEZ-ZAS, S.L.; ROBB, J.A. Effect of subcutaneous vs intramuscular administration of P.G. 600 on estrual and ovulatory responses of prepubertal gilts. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1732-1737, 2000.
- KOKETSU, Y. Technical note: high-performing swine herds improved their reproductive performance differently from ordinary herds for five years. **Journal of Animal Science**, v.85, p.3110-3115, 2007.
- KOTANI, M.; DETHEUX, M.; VANDENBOGAERDE, A.; COMMUNI, D.; VANDERWINDEN, J.M. LE POUL, E.; BREZILLON, S.; TYLDESLEY, R.; SUAREZ-HUERTA, N.; VANDEPUT, F.; BLANPAIN, C.; SCHIFFMANN, S.N.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.34631-34636, 2001.
- LENTS, C.A.; HEIDORN, N.L.; BARB, C.R.; FORD, J.J. Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts. **Reproduction**, v.135, p.879-887, 2008.
- MARTINAT-BOTTÉ, F.; VENTURI, E.; ROYER, E.; ELLEBOUDET, F.; FURSTOSS, V.; RIDREMONT, B.; DRIANCOURT, M.A. Selection of impubertal gilts by ultrasonography optimizes their oestrus, ovulatory and fertility responses following puberty induction by PG600. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.132-137, 2011.
- MATSUI, H.; ASAMI, T. Effects and therapeutic potentials of kisspeptin analogs: regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. **Neuroendocrinology**, v.99, p.49-60, 2014.
- MATSUI, H.; TAKATSU, Y.; KUMANO, S.; MATSUMOTO, H.; OHTAKI, T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.320, p.383-388, 2004.
- MOELLER, S.J.; GOODWIN, R.N.; JOHNSON, R.K.; MABRY, J.W.; BAAS, T.J.; ROBISON, O.W. The National Pork Producers Council Maternal Line National Genetic Evaluation Program: a comparison of six maternal genetic lines for female productivity measures over four parities. **Journal of Animal Science**, v.82, p.41-53, 2004.
- OAKLEY, A.E.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Kisspeptin signaling in the brain. **Endocrine Reviews**, v.30, p.713-743, 2009.
- OKAMURA, H.; YAMAMURA, T.; WAKABAYASHI, Y. Kisspeptin as a master player in the central control of reproduction in mammals: An overview of kisspeptin research in domestic animals. **Animal Science Journal**, v.84, p.369-381, 2013.

- PATTERSON, J.L.; BELTRANENA, E; FOXCROFT, G.R. The effect of gilt age at first estrus and breeding on third estrus on sow body weight changes and long-term reproductive performance. **Journal of Animal Science**, v.88, p.2500-2513, 2010.
- PATERSON, A.M.; MARTIN, G.B. Induction puberty in gilts. 3. Ovulation, plasma oestradiol and progesterone in gilts injected with pregnant mare's serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. **Animal Production**, v.32, p.55-59, 1981.
- REDMOND, J.S.; MACEDO, G.G.; VELEZ, I.C.; CARATY, A.; WILLIAMS, G.L.; AMSTALDEN, M. Kisspeptin activates the hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axis in prepubertal ewe lambs. **Reproduction**, v.141, p.541-548, 2011.
- SAITO, H.; SASAKI, Y.; KOKETSU, Y. Associations between age of gilts at first mating and lifetime performance or culling risk in commercial herds. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.73, p.555-559, 2011.
- SAITO, H.; SAWADA, T.; YAEGASHI, T.; GOTO, Y.; JIN, J.; SAWAI, K.; HASHIZUME, T. Kisspeptin-10 stimulates the release of luteinizing hormone and testosterone in pre- and post-pubertal male goats. **Animal Science Journal**, v.83, p.487-492, 2012.
- STANCIC, I.; STANCIC, B.; BOZIC, A.; ANDERSON, R.; HARVEY, R.; GVOZDIC, D. Ovarian activity and uterus organometry in delayed puberty gilts. **Theriogenology**, v.76, p.1022-1026, 2011.
- TASSIGNY, X.A.; COLLEDGE, W.H. The role of Kisspeptin signaling in reproduction. **Physiology**, v.25, p.207-217, 2010.