

MELATONINA E REPRODUÇÃO ANIMAL: IMPLICAÇÕES NA FISILOGIA OVARIANA

[*Melatonin and animal reproduction: implications on ovarian physiology*]

Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha¹, Maria Helena Tavares de Matos², Laritza Ferreira de Lima¹, Márcia Viviane Alves Saraiva¹, Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves¹, Ana Paula Ribeiro Rodrigues¹, José Ricardo de Figueiredo¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais (LAMOFOPA), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE

²Núcleo de Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento Folicular Ovariano, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE

RESUMO - A atividade reprodutiva das espécies mamíferas pode ser relacionada ao período do ano mais propício para o nascimento das crias. A duração do período de luz (fotoperíodo) está fortemente relacionada a esse mecanismo por intermédio da secreção de melatonina pela glândula pineal. A melatonina é o neurotransmissor responsável por mediar às informações diárias do ciclo de luz/escurecimento, informando ao organismo a duração da noite e, conseqüentemente, o período do ano correspondente. A presença de seus receptores em células hipotalâmicas e células gonadotróficas da hipófise explicam os efeitos da melatonina na secreção de gonadotrofinas (Hormônio folículo estimulante-FSH e Hormônio luteinizante-LH) e na organização dos ritmos sazonais. Além da sua atuação sistêmica, estudos têm sugerido uma atuação deste hormônio na fisiologia ovariana, uma vez que foram detectadas altas concentrações de melatonina no fluido folicular e a presença de seus receptores em células foliculares. Além disso, a sua atuação como antioxidante pode estar associada a vários eventos como o desenvolvimento folicular, a maturação oocitária, a ovulação e a função luteal. Dessa forma, a presente revisão fará uma abordagem geral da influência da melatonina na reprodução animal, enfatizando suas ações sobre a fisiologia ovariana.

Palavras-Chave: Fotoperíodo, foliculogênese, antioxidante.

ABSTRACT - The reproductive activity of mammalian species can be related to the most propitious time of the year to the birth of offspring. The light period duration (photoperiod) is strongly related to this mechanism through the secretion of melatonin by pineal gland. Melatonin is the neurotransmitter responsible for mediate the daily information of light/dark cycle, informing the night duration to the body and, consequently the corresponding time of the year. The presence of melatonin receptor sites in the hypothalamus and the pituitary gland explain its effects on the secretion of pituitary hormones (Follicle stimulating hormone-FSH and Luteinizing hormone-LH) and seasonal rhythm organization. In addition to its systemic action, reports have demonstrated an influence in the ovarian physiology, since high levels in follicular fluid were detected and the presence of melatonin receptors in the ovarian cells has been found. Also, its important function as an antioxidant can influence follicular growth, oocyte maturation, ovulation and luteal function. The purpose of this article is to review the melatonin influence in the animal reproduction, especially in the ovarian physiology.

Keywords: Photoperiod, folliculogenesis, antioxidant.

INTRODUÇÃO

A atividade reprodutiva das espécies mamíferas está diretamente relacionada à adaptação às condições ambientais, tais como temperatura e disponibilidade de alimentos (Goldman, 2001), a qual pode ser restrita ao período do ano que coincide com condições mais propícias para o nascimento das crias. Este mecanismo de restrição é regulado por intermédio da secreção de um hormônio, denominado melatonina, sintetizada e secretada

durante a noite (ciclo escuro) pela glândula pineal. Conforme os dias começam a ficar mais curtos, a exposição dos animais à melatonina aumenta, informando ao organismo a duração da noite e conseqüentemente, o período do ano correspondente (Srinivasan et al., 2009).

Em espécies consideradas de dias curtos, como os ovinos e caprinos, o aumento na secreção de melatonina estimula a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo

hipotálamo. No caso de animais de dias longos, como os eqüinos, o aumento da exposição à melatonina tem efeito oposto, inibindo a secreção de GnRH pelo hipotálamo. Assim, as diferenças na extensão do dia são reconhecidas e transformadas em sinais capazes de ligar ou desligar a atividade sexual de forma espécie-específica (Srinivasan et al., 2009).

Além da atividade sistêmica da melatonina, estudos têm sugerido uma atuação deste hormônio sobre a fisiologia ovariana, uma vez que foram detectadas altas concentrações de melatonina no fluido folicular (Rönnberg et al., 1990). Adicionalmente, a presença de receptores de melatonina nas células foliculares de ratas e camundongos (Soares et al., 2003; Lee et al., 2001) sugerem uma possível produção de melatonina no ovário (Itoh et al., 1999). Sua atuação bem-documentada como antioxidante pode estar associada ao desenvolvimento folicular e à qualidade oocitária, interferindo em processos como a maturação oocitária e ovulação (Tamura et al., 2008). Considerando estas informações, a presente revisão tem como objetivo abordar de maneira geral a influência da melatonina sobre a reprodução animal, enfatizando suas ações sobre a fisiologia ovariana.

FOTOPERÍODO E FOTOPERIODISMO

O fotoperíodo consiste na duração do período de luz de um determinado lugar, dependendo da latitude e da estação do ano, e é representado pelo comprimento de um dia. Já a capacidade dos animais reagirem à duração da luminosidade diária a que estão submetidos é denominada de fotoperiodismo. A maioria das espécies mamíferas usa a detecção de modificações no fotoperíodo para registrar mudanças estacionais, regulando o seu comportamento reprodutivo sazonal (fotoperiodismo). Estas alterações no ciclo de luz-escuro afetam a atividade hormonal da glândula pineal, que desempenha um importante papel no controle neuroendócrino do ritmo circadiano e da fisiologia reprodutiva (Aleandri et al., 1996). A conversão de sinais ambientais em mensagens neuroendócrinas é feita via retina ao núcleo supraquiasmático do hipotálamo, o qual funciona como um controle autônomo para o gânglio cervical superior, de onde as fibras ganglionares posteriores alcançam finalmente a pineal (Maganhin et al., 2009).

Os primeiros achados em mamíferos que relacionam o fotoperíodo como um marcador sazonal foram relatados por Baker & Ranson (1932). Eles observaram que em ratas do campo mantidas

em 15 horas/luz/dia, a reprodução ocorria. Entretanto, quando expostas por um período de 9 horas/luz/dia, a reprodução era bloqueada. Desde então, o fotoperiodismo tem se mostrado como o maior sincronizador das funções sazonais em muitas espécies de mamíferos (Malpaux et al., 2001). Nos animais chamados sazonais, variações no ciclo reprodutivo anual ocorrem em função das mudanças no fotoperíodo e no perfil de secreção da melatonina, sendo classificados como animais de fotoperíodo curto ou longo.

Em animais de fotoperíodo longo, como roedores, hamsters e camundongos, a estação reprodutiva ocorre somente nos dias longos (verão), quando as noites são mais curtas (Silman, 1993). A exposição destas espécies a fotoperíodos curtos provoca a inibição do sistema reprodutivo com involução testicular em machos e anestro em fêmeas (Lercl & Nieschlag, 1992). Em contraste, em animais de fotoperíodo curto, como ovinos e caprinos, a atividade reprodutiva está associada a uma queda no fotoperíodo, com estação reprodutiva no outono e no inverno.

A melatonina exerce um efeito estimulatório no eixo reprodutivo das espécies de dias curtos. Em cabras, observou-se um perfil sérico de secreção da melatonina de acordo com as estações anuais: picos séricos no outono e inverno e queda na primavera e verão (Alila-Johansson et al., 2001). Estudos em ovelhas pinealectomizadas tratadas com melatonina mostraram que a mimetização do padrão de dias curtos produziu um aumento na frequência dos pulsos de Hormônio Luteinizante (LH) (Bittman et al., 1985). Além disso, foram observadas alterações na concentração de melatonina em nível folicular de acordo com o fotoperíodo. A mensuração dos níveis de melatonina em fluido folicular de folículos pré-ovulatórios de mulheres mostrou uma maior concentração (213.4 ± 18.9 pmol/l) durante os meses do outono e inverno do que os meses de primavera e verão (138.4 ± 12.5 pmol/l) (Yie et al., 1995).

EIXO HIPOTALÂMICO- HIPOFISÁRIO-GONADAL

A reprodução é uma função complexa orquestrada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG). Os neurônios hipotalâmicos apresentam uma secreção pulsátil do GnRH que estimula a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e LH da hipófise anterior. Estas gonadotrofinas, por sua vez, atuam nas gônadas para estimular a produção de esteróides (testosterona, estrógeno e progesterona) e promover a gametogênese. Os esteróides gonadais

controlam os caracteres sexuais secundários e também fazem *feedback* com o sistema nervoso, onde influenciam o comportamento sexual e modulam a secreção de GnRH e gonadotrofinas (Sisk & Foster, 2004).

Em espécies sazonais, a reprodução é regulada através da modulação do eixo HHG pela melatonina. Isso ocorre através da ativação de receptores de melatonina encontrados em diferentes locais: neurônios hipotalâmicos liberadores de GnRH, hipófise anterior, gonadotrofos e lactótrofos da hipófise posterior, ovários e testículos (Vanecek, 1998; Roy et al., 2001; Frungieri et al., 2005).

A regulação do eixo reprodutivo tem sido relatada a partir da maturação sexual. Em humanos, tem sido sugerido que o padrão de secreção noturno de melatonina durante a infância inibe a secreção hipotalâmica de GnRH. Antes da puberdade, as concentrações de melatonina são muito altas para permitir a ativação hipotalâmica (Buchanan et al., 2001). Porém, aos nove ou dez anos de idade, um declínio na melatonina sérica sinaliza o hipotálamo e o início da puberdade. O mecanismo pelo qual a melatonina inibe o eixo reprodutivo até a puberdade não é claro. Porém há evidências de que a melatonina esteja envolvida no controle da secreção pulsátil de LH (Cavallo, 1993).

A partir da puberdade, a melatonina irá apresentar efeitos estimulatórios ou inibitórios sobre o eixo HHG dependendo da espécie. Em roedores de laboratório, o efeito da melatonina sobre o eixo HHG é predominantemente inibitório. Em células liberadoras de GnRH com expressão de receptores para melatonina (MT1 e MT2), observou-se que a melatonina reduziu a expressão do mRNA para o GnRH (Roy et al., 2001). Isso sugere a possibilidade de um efeito direto da melatonina na secreção de GnRH em neurônios hipotalâmicos. Por outro lado, estudos recentes sugerem um efeito indireto na regulação do eixo HHG através do estímulo da secreção de proteínas denominadas de kisseptinas (Berlinguer et al., 2009). Considerando que as kisseptinas potencialmente influenciam a secreção de FSH/LH, a ativação dessa via endócrina pela melatonina poderia gerar um ambiente hormonal mais propício para o crescimento folicular e a maturação oocitária.

SÍNTESE DA MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina produzida a partir do aminoácido triptofano, principalmente na glândula pineal, como também em outros locais: retina, glândula lacrimal

extra-orbitária, trato gastrointestinal, pele e ovário (Hardeland et al., 1993; Huether, 1993; Itoh et al., 1999).

Na glândula pineal, a via biossintética da melatonina inicia com a conversão do triptofano em 5-hidroxitriptofano por intermédio da ação da triptofano-5-hidroxilase (T-5-H). Seguindo a rota, a enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTD) catalisa a oxidação do 5-hidroxitriptofano em serotonina. Seqüencialmente, a serotonina é convertida em N-acetilserotonina através de uma reação de acetilação da enzima N-acetiltransferase (NAT) e por fim, a enzima citosólica hidroxindol-O-metiltransferase, atualmente denominada acetilserotonina O-metiltransferase (ASOMT) (Reiter et al., 2009), catalisa a reação de metilação para a formação da melatonina. A Figura 1 mostra as diferentes etapas envolvidas na biossíntese de melatonina.

Além da produção central de melatonina, achados apontam para uma possível produção intrínseca de melatonina no ovário. Itoh et al. (1999), através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, detectaram a presença dos precursores serotonina e N-acetilserotonina e a atividade das enzimas NAT e ASOMT em extratos de ovário humano. Além disso, a melatonina pode ser encontrada em altas concentrações no fluido folicular de folículos pré-ovulatórios humanos, com concentrações significativamente maiores que as concentrações periféricas (Rönnerberg et al., 1990). Este fato sugere que seja possível a regulação da reprodução pela melatonina em nível folicular, uma vez que este hormônio está presente no ovário.

EXPRESSÃO DOS RECEPTORES E PADRÕES DE SINALIZAÇÃO DA MELATONINA

A ação da melatonina nas células de espécies mamíferas pode ocorrer de quatro formas: 1) através de sua ligação a proteínas intracelulares como a calmodulina; 2) “sequestro” de radicais livres; 3) ligação a receptores nucleares da família “orphan” e 4) ligação a receptores de melatonina localizados na membrana plasmática (Macchi & Bruce, 2004).

Em mamíferos, são descritos dois principais tipos de receptores de melatonina acoplados à membrana celular: MT1 e MT2. Ambos são pertencentes à família de receptores ligados à proteína G, os quais possuem estruturas moleculares, características farmacológicas e localizações cromossômicas distintas entre si (Slaugenhaupt et al., 1995; Reppert et al., 1996; Dubocovich et al., 1997). Os receptores

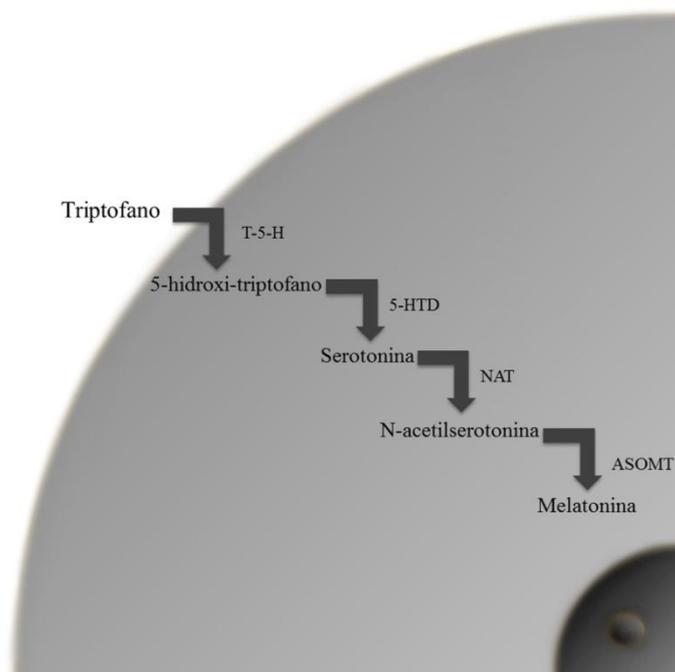


Figura 1. Etapas envolvidas na biossíntese da melatonina. Precusores e enzimas participantes da síntese de melatonina em qualquer tipo celular.

MT1 e MT2 apresentam estrutura protéica com 350 e 362 aminoácidos, respectivamente, com pesos moleculares calculados entre 39-40 KDa (Rivera-Bermudez et al., 2004). Estes receptores pertencem a um grupo distinto dentro da superfamília de receptores acoplados à proteína G que apresentam um domínio NRY, e não o domínio DRY (ou ERY), presente em todos os outros receptores desta superfamília (Reppert et al., 1996). Este domínio presente no receptor MT1 está envolvido na sinalização celular.

Os receptores MT1 e MT2 são constituídos pelas proteínas heterotriméricas Gi: α , β e γ . A ativação destes receptores promove a dissociação das proteínas G em dímeros α e $\beta\gamma$, que interagem com várias moléculas efetoras envolvidas na transmissão da sinalização celular (Masana et al., 2001). Os efeitos incluem mudanças em nucleotídeos cíclicos intracelulares (cAMP, cGMP) e níveis de cálcio, ativação de certos subtipos de proteínas quinases C, localização intracelular de receptores de hormônios esteróides e a regulação de proteínas G sinalizadoras (Pandi-Perumal et al., 2008). Alguns sistemas efetores envolvidos na sinalização dos receptores de melatonina incluem adenilil ciclase, fosfolipase C, fosfolipase A2, canais de potássio e cálcio e guanilil ciclase (Dubocovich & Markowska, 2005). No

entanto, dependendo do tecido, órgão e espécie, a melatonina ativa diferentes cascatas de segundos mensageiros pela interação com o mesmo tipo de receptor.

Outro ponto importante a ser observado é a existência de um terceiro receptor de melatonina, MT3, relacionado a locais de ligação nucleares (Vincent et al., 2010). Este terceiro receptor é uma enzima identificada como uma quinona redutase 2, membro da superfamília de receptores nucleares RZR/ROR (Mor et al., 1999). As quinonas redutases participam da proteção contra estresse oxidativo pela prevenção das reações de transferências de elétrons das quinonas (Pendi-Perumal et al., 2006).

Os receptores para melatonina estão localizados em diversos compartimentos no organismo. No sistema reprodutor feminino, foram identificados RNAm para os receptores MT1 e MT2 em células da granulosa ovarianas (Niles et al., 1999; Soares et al., 2003). Isto sugere que este hormônio pode ter uma ação sobre a esteroidogênese dessas células e sobre a função folicular (Webley et al., 1986; Tamura et al., 1998). Após estudar células da granulosa-luteais humanas, Woo et al. (2001) mostraram que a melatonina pode regular a produção de progesterona (P4) e a expressão gênica para receptores de GnRH e

LH. Além disso, em células ovarianas, fatores como estrógenos endógenos regulam a atividade funcional dos receptores de melatonina (Masana et al., 2005).

FUNÇÕES DA MELATONINA

Antioxidante

Ianas et al. (1991) foram os primeiros a sugerirem que a melatonina poderia funcionar como um antioxidante. Numerosos estudos subsequentes têm confirmado o efeito antioxidante deste hormônio e vários artigos de revisão têm relatado a extensiva pesquisa publicada nesse campo.

A melatonina tem a capacidade de seqüestrar ambas as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN) incluindo ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), óxido nítrico (NO), e ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) (Allegra et al., 2003). A melatonina por si só não é apenas um “seqüestrador” de radicais livres, mas os metabólitos que são formados durante essas interações (i.e., 3-hidroxi-melatonina cíclica, N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina, e N1-acetil-5-metoxikinuramina) são da mesma forma excelentes antioxidantes (Reiter et al., 2003). Conforme constatado para outras substâncias, estudos *in vitro* indicam que dependendo da concentração, a melatonina poderá apresentar atividade antioxidante ou pró-oxidante (Vijayalaxmi et al., 2004).

Em um sistema *in vitro* celular, Tan et al. (1993) documentaram a habilidade da melatonina em neutralizar radicais hidroxil altamente tóxicos mais eficientemente que a glutatona reduzida (um antioxidante endógeno) e melhor que o manitol (um antioxidante encontrado em plantas). Além disso, o radical peróxil, que é produzido durante a oxidação de ácidos polinsaturados, é “seqüestrado” pela melatonina com uma eficiência maior que a da vitamina E, e duas vezes mais efetiva que o trolox, análogo sintético da vitamina E, solúvel em água (Pieri et al., 1994). A melatonina também é capaz de reduzir quantidades excessivas de óxido nítrico, conhecido por causar mudanças citotóxicas nas células (Noda et al., 1999).

Os mecanismos envolvidos na ação antioxidante da melatonina estão no fato de tratar-se de uma molécula altamente eletroreativa. Ela age primariamente como um poderoso doador de elétrons e detoxifica espécies reativas de oxigênio eletrodeficientes (Vijayalaxmi et al., 2002). Além deste mecanismo de ação, a melatonina estimula a atividade de outras enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase,

glutatona redutase e catalase (Tamura et al., 2008). Estudos têm mostrado que a melatonina melhora os níveis intracelulares de glutatona por estimular a enzima limitante de sua biossíntese, γ -glutamilcisteína sintetase. Baydas et al. (2002) encontraram que uma deficiência de melatonina induzida por uma pinealectomia reduzia a atividade da glutatona peroxidase em vários tecidos de ratos. Ozturk et al. (2000) observaram elevados níveis na atividade da SOD após administração de 10 mg/kg de melatonina por sete dias, enquanto Liu & Ng (2000) relataram uma melhora na atividade da SOD após uma única injeção de melatonina (5 mg/kg).

AÇÃO DA MELATONINA NA FISIOLOGIA OVARIANA

Crescimento e atresia folicular

A população folicular ovariana pode variar de milhares (ovinos e caprinos - Amorim et al., 2000; Lucci et al., 1999) a milhões (mulheres - Erickson, 1986) e pode ser classificada em dois grandes grupos: folículos pré-antrais ou não-cavitários (primordial, primário e secundário) e folículos antrais ou cavitários (terciário e pré-ovulatório) (Figura 2). O desenvolvimento folicular ovariano é um processo complexo que envolve mecanismos endócrinos, parácrinos e autócrinos. A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (Van Den Hurk & Zhao, 2005). Os mecanismos que controlam a foliculogênese ainda não estão plenamente esclarecidos, entretanto sabe-se que diversos fatores de crescimento e hormônios estão envolvidos.

Um dos fatores hormonais que se acredita regular o desenvolvimento folicular é a melatonina. Os estudos que demonstram a presença de seus receptores (MT1 e MT2) (Soares et al., 2003; Lee et al., 2001; Yie et al., 1995; Niles et al., 1999) no folículo suportam a hipótese de sua atuação na fisiologia ovariana. Entretanto, ainda são deficientes os estudos que relacionam a ação da melatonina sobre a foliculogênese e ainda há poucas informações sobre a sua atuação na fase inicial, ou pré-antral. Adriaens et al. (2006) observaram que a utilização de 100 μ M de melatonina aumentou a produção de P4 e androstenediona (A_4) em folículos secundários (100-130 μ m de diâmetro) de camundongos cultivados por 12 dias, enquanto a adição de doses elevadas deste hormônio (2 mM) foi tóxica aos folículos, diminuindo a viabilidade

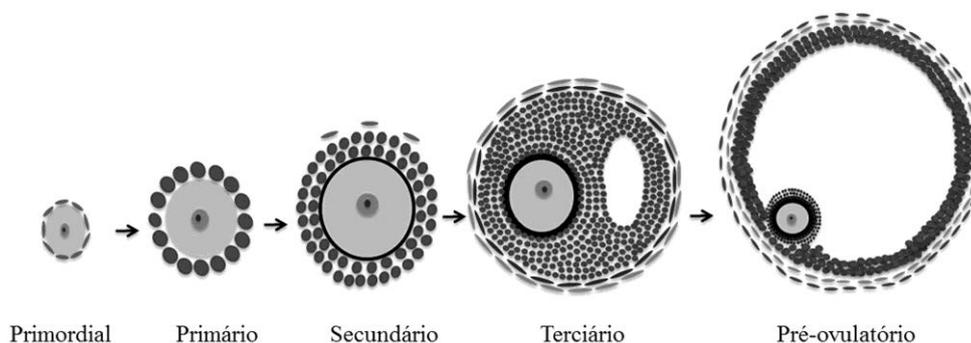


Figura 2. Estádios do desenvolvimento folicular nas fases pré-antral e antral.

folicular. Contrariamente, em um estudo para avaliar a capacidade radioprotetora da melatonina para prevenir a atresia folicular provocada por radiação- γ , Kim & Lee (2000) ao utilizar melatonina exógena (100 μg) em camundongas encontraram uma maior proporção de folículos em estágio inicial de desenvolvimento (primordiais e primários) em comparação ao grupo irradiado.

Por outro lado, o estudo da ação da melatonina na foliculogênese antral, ou seja, sobre folículos que apresentam antro é melhor elucidado. Já foi detectada a presença de melatonina em fluido folicular de folículos pré-ovulatórios humanos em concentrações superiores às concentrações séricas (Rönnberg et al., 1990). Em um estudo com mulheres submetidas à fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embriões (TE), as concentrações de melatonina em grandes folículos (> 10 mm) foram superiores às de pequenos folículos (< 10 mm) (Nakamura et al., 2003). Entretanto, Shi et al. (2009), em um modelo suíno, relataram que pequenos folículos (< 3 mm) continham concentrações de melatonina significativamente superiores aos médios (3 – 8 mm) e grandes (< 8 mm) folículos.

As elevadas concentrações foliculares de melatonina podem ser devidas a uma fonte externa ou uma possível produção intrínseca no ovário. Itoh et al. (1999) detectaram a presença dos precursores serotonina e N-acetilserotonina e a atividade das enzimas NAT e ASOMT em extratos de ovário humano. Entretanto, há um consenso entre os pesquisadores ao afirmarem que a melatonina encontrada no fluido folicular é derivada da circulação periférica. Tamura et al. (2008) observaram que o tratamento de mulheres inférteis

com melatonina (3 mg via oral) resultou em maiores concentrações de melatonina em seu fluido folicular (após tratamento: 432 ± 260 pg/ml vs. controle: 112 ± 51 pg/ml).

Os folículos antrais recrutados para o crescimento são caracterizados pela expressão de RNAm para enzimas esteroidogênicas, receptores para gonadotrofinas e fatores reguladores locais. Woo et al. (2001) demonstraram a ação da melatonina na modulação da resposta folicular ao LH através do aumento da expressão de RNAm para receptores de LH em células da granulosa em humanos.

Além disso, a melatonina pode estimular o desenvolvimento folicular por promover o aumento da produção do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), um importante fator de crescimento mitógeno nas células da granulosa (Schaeffer & Sirotkin, 1997). Picinato et al. (2008) demonstraram um efeito da melatonina (0,1 mM) na expressão do receptor de IGF-I. Outros estudos demonstram a ação da melatonina na prevenção da apoptose (mecanismo de morte celular), através da indução da expressão de *Bcl2* e reduzindo a atividade da caspase-3 (Guha et al., 2007; Molpeceres et al., 2007). Os membros da família *Bcl2* e as enzimas denominadas caspases são importantes para a regulação da apoptose e a sua deleção reduz o número de folículos saudáveis (Ratts et al., 1995).

Esteroidogênese

Esteróides ovarianos desempenham um papel essencial na foliculogênese mamífera. Tem sido demonstrado que uma característica predominante dos folículos dominantes é a sua grande capacidade

de produzir esteróides, especialmente o 17β -estradiol (E_2). A aquisição da capacidade esteroidogênica parece estar, portanto, envolvida com a seleção de folículos dominantes com boa qualidade oocitária (Yuan et al., 2008).

Alguns estudos sugerem que a melatonina pode modular a esteroidogênese das células foliculares. Tanavde & Maitra (2003) investigaram a expressão dos genes CYP 11A, CYP17 e CYP 19, específicos para a produção de P_4 , A_4 e E_2 , respectivamente, em folículos antrais suínos expostos à melatonina. Neste sistema, a melatonina inibiu CYP 11A (devido a um *feed-back* negativo relacionado às altas concentrações de P_4) e CYP 17, porém sem efeitos na expressão de CYP 19.

A maioria dos estudos *in vitro* tem demonstrado efeitos estimulatórios da melatonina sobre a produção de P_4 em células da granulosa de ratas (Fiske et al., 1984), vacas (Webley et al., 1986), ovelhas (Baratta & Tamanini, 1992) e mulheres (Brzezinski et al., 1992). Além disso, a utilização de 100 ng/ml de melatonina estimulou a produção de P_4 e A_4 em um cultivo de 30 horas em folículos antrais suínos (Tanavde & Maitra, 2003). Entretanto, Sirotkin (1994) reportaram um efeito inibitório da melatonina sobre a produção de P_4 em células da granulosa nesta mesma espécie.

Com relação à produção de E_2 , alguns estudos têm sugerido um efeito estimulatório da melatonina na produção de E_2 em células da granulosa de suínos e humanos (Yie et al., 1995; Sirotkin et al., 1994). Entretanto, a maioria dos estudos não demonstra efeitos estimulatórios da melatonina em células da granulosa de mulheres (Brzezinski et al., 1992), vacas (Webley et al., 1986), ovelhas (Baratta & Tamanini, 1992) e hamsters (Tamura et al., 1998).

Maturação oocitária e desenvolvimento embrionário

Apesar dos grandes avanços em biotecnologias reprodutivas, a baixa qualidade oocitária permanece como um grande problema para infertilidade feminina. Dentre os fatores concorrentes para o desenvolvimento oocitário, podemos citar a produção das EROs dentro do folículo ovariano principalmente durante o processo ovulatório, e o estresse oxidativo desencadeado por eles (Sugino, 2005). O equilíbrio entre a produção de ERO e a habilidade dos antioxidantes em reduzi-los é um importante fator para a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário. A melatonina apresenta-se, portanto, como um fator em potencial

para proteger o oócito e suas células circundantes contra os danos ocasionados pelo estresse oxidativo.

Em suínos, a suplementação do meio de maturação oocitária *in vitro* com melatonina (10 ng/ml) resultou em um maior percentual de oócitos em metáfase II e uma porcentagem significativamente superior de blastocistos, embora sem efeitos sobre as taxas de clivagem e o número de células do blastocisto (Kang et al., 2009). Entretanto, quando Shi et al. (2009) realizaram uma suplementação simultânea do meio de maturação oocitária e do meio de cultivo de embriões suínos com melatonina (10^{-9} M), foram obtidas melhores taxas de clivagem e formação de blastocisto ($79 \pm 8,4\%$ e $35 \pm 6,7\%$, respectivamente). Em caprinos, a suplementação *in vivo* com melatonina (3 mg) não afetou a maturação oocitária *in vitro*, entretanto promoveu uma taxa de clivagem (82,5%) e formação de blastocistos (31,5%) significativamente superior em comparação ao controle (Berlinguer et al., 2009). Manjunatha et al. (2008) utilizaram 20 e 50 μ M de melatonina no meio de maturação de oócitos bubalinos e obtiveram maiores percentuais de maturação oocitária (90,3% e 88,8%, respectivamente) e produção embrionária (28,4 e 27,2%, respectivamente).

A melatonina também tem sido testada com sucesso para promover o desenvolvimento de embriões de camundongos *in vitro* (Ishizuka et al., 2000). Além disso, não foram demonstrados efeitos prejudiciais no desenvolvimento embrionário de ratos ou camundongos durante testes de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* (Jahnke et al., 1999). Em ovinos, a melatonina (1 μ g/ml) melhorou a sobrevivência de embriões descongelados, aumentou a taxa de embriões eclodidos após 24 horas e reduziu o percentual de embriões degenerados ao final do cultivo *in vitro* (Abecia et al., 2002). Em bovinos, a melatonina (10^{-4} M) na presença de 20% de O_2 em cultivo *in vitro* obteve um percentual de 68,9% de formação de blastocisto em comparação com a utilização da tensão de 7% de O_2 (Papis et al., 2007).

Ovulação e Função Luteal

A ovulação é o processo pelo qual ocorre a ruptura do folículo pré-ovulatório, resultando na liberação do oócito e subsequente formação do corpo lúteo. Este processo ocorre como resultado de uma interação dinâmica entre a onda pré-ovulatória de LH e fatores locais incluindo esteróides, prostaglandinas e peptídeos. Nessa fase, há um aumento na concentração de P_4 que é essencial para a ovulação e a luteinização (Espey et al., 1994). A elevada concentração de melatonina no folículo pré-

ovulatório pode estar envolvida com a produção de P₄ resultando em ovulação e luteinização (Nakamura et al., 2003).

A ovulação é similar a uma resposta inflamatória local com a produção de ERO e ERN (Espey et al., 1994). A maior fonte de ERO parece ser as células inflamatórias presentes no ovário durante a ovulação, como macrófagos e neutrófilos (Brännström et al., 1993). Parece que a melatonina presente em folículos pré-ovulatórios também está relacionada à proteção do oócito e células da granulosa, contra os danos ocasionados por EROs.

Como relatado, a ovulação e a subsequente luteinização, caracterizada por um programa de diferenciação terminal do folículo ovulado em corpo lúteo, são desencadeadas pela onda pré-ovulatória de LH. A formação do corpo lúteo é iniciada por uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas nas células da granulosa e teca interna do folículo pré-ovulatório (Richards et al., 2002). Alguns estudos relacionam a melatonina à fase luteal da fisiologia ovariana. Em humanos, já foi demonstrada a ação da melatonina sobre a produção de P₄ em células da granulosa-luteais (Yie et al., 1995). Essa ação seria mediada através de um aumento na expressão de receptores para LH desencadeado pela melatonina (Woo et al., 2001). Por outro lado, outros estudos não demonstraram efeitos negativos da melatonina sobre a produção de P₄ em células luteinizantes (Schaeffer et al., 1997).

Fatores bioquímicos e endócrinos como prostaglandina F-2 α , oxitocina e ERO suprimem a produção de P₄ em células luteais (Wiltbank & Ottobre, 2003; Stormshak, 2003). A prostaglandina F-2 α é de particular interesse, uma vez que suas ações autócrinas e parácrinas podem induzir a regressão do corpo lúteo. A Melatonina (10 mM) diminuiu a secreção de prostaglandina F-2 α do útero de ratas, sugerindo sua atuação na função luteal e manutenção da produção de P₄ (Gimeno et al., 1980).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A melatonina desempenha um importante papel no controle neuroendócrino da fisiologia reprodutiva, principalmente na conversão de sinais ambientais e organização do ritmo circadiano em animais sazonais. Além desse efeito sistêmico, a presença de seus receptores (MT1 e MT2) ao longo do eixo HHG e mais especificamente em células ovarianas sugerem um controle intrínseco da reprodução relacionado ao ovário.

Apesar de sua ação central na reprodução animal, vários esforços vêm sendo direcionados para elucidação do papel do hormônio da pineal na fisiologia ovariana. A melatonina pode atuar na foliculogênese, principalmente na fase antral, em processos como a diferenciação das células da granulosa (expressão de receptores para LH) e produção esteroidogênica. Outros efeitos incluem a indução da expressão de fatores de crescimento tais como o IGF-I e inibição da atresia. Entretanto, pouco se sabe a respeito do papel desse hormônio na fase pré-antral da foliculogênese. A elucidação do papel da melatonina nesta fase auxiliará no conhecimento dos mecanismos regulatórios da foliculogênese inicial, que por sua vez contribuirá para otimização do potencial reprodutivo de fêmeas mamíferas por meio da utilização da numerosa população de oócitos imaturos incluídos em folículos pré-antrais em programas de reprodução assistida.

REFERÊNCIAS

- Abecia J.A., Forcada F. & Zuniga O. 2002. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos in vitro. *Veterinary Research Communications*. 26 (2): 151–158.
- Adriaens I., Jacquet P., Cortvrindt R., Janssen K. & Smitz J. 2006. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology*. 228 (2-3): 333–343.
- Aleandri V., Spina V. & Morini A. 1996. The pineal gland and reproduction. *Human Reproduction*. 2 (3): 225–235.
- Alila-Johansson A., Eriksson L., Soveri T. & Laakso M. L. 2001. Seasonal Variation in Endogenous Serum Melatonin Profiles in Goats: A Difference between Spring and fall. *Journal of Biological Rhythms*. 16 (3): 254-263.
- Allegra M., Reiter R.J., Tan D.X., Gentile C., Tesoriere L. & Livrea M.A. 2003. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *Journal of Pineal Research*. 34 (1): 1–10.
- Amorim C.A., Rodrigues A.P.R., Lucci C.M., Figueiredo J.R. & Gonçalves P.B.D. 2000. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. *Small Ruminant Research*. 37: 269-277.
- Baker J. R. & Ranson R. M. 1932. Factors affecting the breeding of the field mouse (*Microtus agrestis*): I. Light. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 110: 313-322.
- Baratta M. & Tamanini C. 1992. Effect of melatonin on the in vitro secretion of progesterone and estradiol 17 β by ovine granulosa cells. *Acta Endocrinologica*. 127 (4): 366–370.
- Baydas G., Gursu M.F., Yilmaz S., Canpolat S., Yasar A., Cikim G. & Canatan H. 2002. Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neuroscience Letters*. 323 (3): 195–198.
- Berlinguer F., Leoni G.G., Succu S., Spezzigu A., Madeddu M., Satta V., Bebbere D., Contreras-Solis I., Gonzalez-Bulnes A. &

- Naitana S. 2009. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. *Journal of Pineal Research*. 46 (4): 383–391.
- Bittman E.L., Kaynard A.H., Olster D.H., Robinson J.E., Yellon S.M. & Karsch F.J. 1985. Pineal melatonin mediates photoperiod control of pulsatile luteinizing hormone in the ewe. *Neuroendocrinology*. 40, 409–418.
- Brännström M., Mayrhofer G. & Robertson S.A. 1993. Localization of leukocyte subsets in the rat ovary during the periovulatory period. *Biology of Reproduction*;48: 277–286.
- Brzezinski A., Schenker J.G., Fibich T., Laufer N. & Cohen M. 1992. Effects of melatonin on progesterone production by human granulosa lutein cells in culture. *Fertility and Sterility*. 58: 526–529.
- Buchanan T.W., Brechtel A., Sollers J.J. & Lovallo W.R. 2001. Exogenous cortisol exerts effects on the startle reflex independent of emotional modulation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 68 (2): 203–210.
- Cavallo A. 1993. The pineal gland in human beings: relevance to pediatrics. *Journal of Pediatrics*. 123 (6): 843-851.
- Dubocovich M.L., Masana M.I., Iacob, S. & Sauri, D.M. 1997. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel_{1a} and Mel_{1b} recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML₁ presynaptic heteroreceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 355 (3): 365-375.
- Dubocovich M.L. & Markowska M. 2005. Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. *Endocrine*. 27 (2): 101–110.
- Erickson G.F. 1986. An analysis of follicles development and ovum maturation. In: *Seminars in Reproductive Endocrinology*, San Diego-California. 233-254.
- Espey L.L. 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproduction*. 50 (2): 233–238.
- Fiske V.M., Parker K.L., Ulmer R.A., Ow C.H. & Aziz N. 1984. Effect of melatonin alone or in combination with human chorionic gonadotropin or ovine luteinizing hormone on the in vitro secretion of estrogens or progesterone by granulosa cells of rats. *Endocrinology*. 114 (2): 407–410.
- Frungieri M.B., Mayerhofer A., Zitta K., Pignataro O.P., Calandra R.S. & Gonzalez-Calvar S.I. 2005. Direct Effect of Melatonin on Syrian Hamster Testes: Melatonin Subtype 1a Receptors, Inhibition of Androgen Production, and Interaction with the Local Corticotropin-Releasing Hormone System. *Endocrinology*. 146 (3): 1541–1552.
- Gimeno M.F., Landa A., Sterin-Speziale N., Cardinali D.P. & Gimeno A.L. 1980. Melatonin blocks in vitro generation of prostaglandin by the uterus and hypothalamus. *European Journal of Pharmacology*. 62 (4): 309–317.
- Goldman B.D. 2001. Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms*. 16 (4): 283- 301.
- Guha M., Maity P., Choubey V., Mitra K., Reiter R.J. & Bandyopadhyay U. 2007. Melatonin inhibits free radical-mediated mitochondrial-dependent hepatocyte apoptosis and liver damage induced during malarial infection. *Journal of Pineal Research*. 43 (4): 372–381.
- Hardeland R., Reiter R., Poeggeler B. & Tan, D.X. 1993. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 17 (3): 347–357.
- Huether G. 1993. The contribution of extrapineal site of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia*. 49: 665–670.
- Ianas O., Olnescu R. & Badescu I. 1991. Melatonin involvement in oxidative stress. *Romanian Journal of Endocrinology*. 29: 147–153.
- Itoh M. T., Ishizuka B., Kuribayashi Y., Amemiya A. & Sumi Y. 1999. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Molecular Human Reproduction*. 5 (5): 402–408.
- Ishizuka B., Kuribayashi Y., Murai K., Amemiya A. & Itoh M. 2000. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. *Journal of Pineal Research*. 28 (1): 48–51.
- Jahnke G., Marr M., Myers C., Wilson R., Travlos G. & Price C. 1999. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*. 50 (2): 271–279.
- Kang J.T., Koo O.J., Kwon D.K., Park H.J., Jang G., Kang S.K. & Lee B.C. 2009. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. *Journal of Pineal Research*. 46: 22–28.
- Kim J.K. & Lee C.J. 2000. Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in gamma-irradiated mouse. *Mutation Research*. 449 (1-2): 33-9.
- Lee C., Do B.R., Lee Y., Park J., Kim S., Kim J., Roh S., Yoon Y. & Yoon H. 2001. Ovarian expression of melatonin Mel1a receptor mRNA during mouse development. *Molecular Reproduction and Development*. 59 (2): 126–132.
- Lerchl A. & Nieschlag E. 1992. Interruption of nocturnal pineal melatonin synthesis in spontaneous recrudescing Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Journal of Pineal Research*. 13 (1): 36–41.
- Liu F. & Ng T.B. 2000. Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues. *Biochemistry and Cell Biology*. 78: 447–453.
- Lucci C.M., Amorim C.A., Bão S.N., Figueiredo J.R., Rodrigues A.P.R., Silva J.R. & Gonçalves P.B.D. 1999. Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 56: 39-49.
- Macchi M.M. & Bruce J.N. 2004. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 25 (3-4): 177–195.
- Maganhin C. C., Carbonel A. A. F., Hatty J. H., Fuchs L. F. P., Oliveira-Júnior I. S. & Simões M. J. 2008. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 54 (3): 267-271.
- Malpoux B., Migaud M., Tricoire H. & Chemineau P. 2001. Biology of Mammalian Photoperiodism and the Critical Role of the Pineal Gland and Melatonin. *Journal of Biological Rhythms*. 16 (4): 336-347.

- Manjunatha B.M., Devaraj M., Gupta P.S.P., Ravindra J.P. & Nandi S. 2009. Effect of Taurine and Melatonin in the Culture Medium on Buffalo In Vitro Embryo Development. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (1): 12-16.
- Masana M.I. & Dubocovich M.L. 2001. Melatonin Receptor Signaling: Finding the Path Through the Dark. *Science-Signal Transduction Knowledge Environment*. 107: pe39.
- Masana M.I., Soares J.M. Jr & Dubocovich M.L. 2005. 17 β -Estradiol Modulates hMT1 Melatonin Receptor Function. *Neuroendocrinology*. 81 (2): 87-95.
- Molpeceres V., Mauriz J.L., García-Mediavilla M.V., González P., Barrio J.P. & González-Gallego J. 2007. Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 62 (7):687-695.
- Mor M., Plazzi P.V., Spadoni G. & Tarzia G. 1999. Melatonin. *Current Medicinal Chemistry*. 6: 501-518.
- Nakamura Y., Tamura H., Takayama H. & Kato H. 2003. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertility and Sterility*. 80 (4): 1012-1016.
- Niles L.P., Wang J., Shen L., Lobb D.K. & Younglai E.V. 1999. Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 156 (1): 107-110.
- Noda Y., Mori A., Liburdy R. & Packer L. 1999. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. *Journal of Pineal Research*. 27: 159-163.
- Ozturk G., Coskun S., Erbas D. & Hasanoglu E. 2000. The effect of melatonin on liver superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels. *The Japanese Journal of Physiology*. 50 (1): 149-153.
- Pandi-Perumal S.R., Srinivasan V., Maestroni G.J.M., Cardinali D.P., Poeggeler B. & Hardeland, R. 2006. Melatonin: nature's most versatile biological signal? *FEBS Journal*. 273: 2813-2838.
- Pandi-Perumal S.R., Trakht I., Srinivasan V., Spence D.W., Maestroni G.J., Zisapel N. & Cardinali D.P. 2008. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology*. 85 (3) 335-353.
- Papis K., Poleszczuk O., Wenta-Muchalska E. & Modlinski J.A. 2007. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. *Journal of Pineal Research*. 43 (4): 321-326.
- Picinato M.C., Hirata A.E., Cipolla-Neto J., Curi R., Carvalho C.R., Anê G.F. & Carpinelli A. R. 2008. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. *Journal of Pineal Research*. 44 (1): 88-94.
- Pieri C., Marra M., Monari R., Recchioni R. & Marcheselli F. 1994. Melatonin: A peroxyl radical scavenger more potent than vitamin E. *Life Sciences*. 55: 271-276.
- Ratts V.S., Flaws J.A., Kolp R., Sorenson C.M. & Tilly J.L. 1995. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology*. 136: 3665-3668.
- Reiter R.J. & Tan D.X. 2003. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovascular Research*. 58:10-19.
- Reiter R.J., Tan D.X., Manchester L.C., Paredes S.D., Mayo J.C. & Sainz R.M. 2009. Melatonin and reproduction revised. *Biology of Reproduction*. 81 (3): 445-456.
- Reppert S.M., Weaver D.R. & Godson C. 1996. Melatonin receptors step into the light: cloning and classifications of subtypes. *Trends in Pharmacological Sciences*. 107: 100-102.
- Richards J.S., Russell D.L., Ochsner S. & Espey L.L. 2002. Ovulation: new dimensions and new regulators sponse. *Annual Review of Physiology*. 64: 69-92.
- Rivera-Bermudez M.A., Masana M.I., Brown G.M., Earnest D.J. & Dubocovich M.L. 2004. Immortalized cells from the rat suprachiasmatic nucleus express functional melatonin receptors. *Brain Research*. 1002 (1-2): 21-27.
- Rönnberg L., Kauppila A., Leppäluoto J., Martikainen H. & Vakkuri O. 1990. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 71(2): 492-6.
- Roy D., Angelini N. L., Fujieda H., Brown G. M. & Belsham, D.D. 2001. Cyclical Regulation of GnRH Gene Expression in GT1-7 GnRH-Secreting Neurons by Melatonin. *Endocrinology*. 142 (11): 4711-4720.
- Schaeffer H.J. & Sirotkin A.V. Melatonin and serotonin regulate the release of insulin-like growth factor-I, oxytocin and progesterone by cultured human granulosa cells. 1997. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 105 (2): 109-112.
- Shi J.M., Tian X.Z., Zhou G.B., Wang L., Gao C., Zhu S.E., Zeng S.M., Tian J.H. & Liu G.S. 2009. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. *Journal of Pineal Research*. 47 (4): 318-323.
- Silman R.E. 1993. Melatonin: a contraceptive for the nineties. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 49 (1-2): 3-9.
- Sirotkin A.V. 1994. Direct influence of melatonin on steroid, nonapeptide hormones, and cyclic nucleotide secretion by granulosa cells isolated from porcine ovaries. *Journal of Pineal Research*. 17 (3): 112-117.
- Sisk C.L. & Foster D.L. 2004. The neural basis of puberty and adolescence. *Nature Neuroscience*. 7: 1040-1047.
- Slaughaupt S.A., Roca A.L., Liebert C.B., Altherr M.R., Gusella J.F. & Reppert S.M. 1995. Mapping of the gene for the Mella-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a). *Genomics*. 27(2): 355-357.
- Soares J. M. Jr, Masana M. I., Ersahin C. & Dubocovich M. L. 2003. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 306 (2): 694-702.
- Srinivasan V., Spence W.D., Pandi-Perumal S. R., Zakharia R., Bhatnagar K. P. & Brzezinski A. 2009. Melatonin and human reproduction: Shedding light on the darkness hormone. *Gynecological Endocrinology*. 25 (12): 779-785.
- Stormshak F. 2003. Biochemical and endocrine aspects of oxytocin production by the mammalian corpus luteum. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1 (1): 92-97.
- Sugino N. 2005. Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reproductive Medicine and Biology*. 4 (1): 31-44.
- Tamura H., Nakamura Y., Korkmaz A., Manchester L. C., Tan D. X., Sugino N. & Reiter R. J. 2009. Melatonin and the ovary:

physiological and pathophysiological implications. *Fertility and Sterility*. 92 (1): 328 – 343.

Tamura H., Nakamura Y., Takiguchi S., Kashida S., Yamagata Y., Sugino N. & Kato H. 1998. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. *Journal of Pineal Research*. 25 (3): 135–141.

Tamura H., Takasaki A., Miwa I., Taniguchi K., Maekawa R., Asada H., Taketani T., Matsuoka A., Yamagata Y., Shimamura K., Morioka H., Ishikawa H., Reiter R. J. & Sugino N. 2008. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*. 44 (3): 280–287.

Tan D.X., Chen L.D., Poeggeler B. & Manchester L.C. 1993. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine*. 1: 57-60.

Tanavde V.S. & Maitra A. 2003. In vitro modulation of steroidogenesis and gene expression by melatonin: a study with porcine antral follicles. *Endocrine Research*. 29 (4): 399–410.

Van Den Hurk R. & Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63: 1717-1751.

Vanecek J. Cellular Mechanisms of Melatonin Action. 1998. *Physiological Reviews*. 78 (3): 687-721.

Vijayalaxmi, Reiter R.J., Tan D.X., Herman T.S. & Thomas C.R.Jr. 2004. Melatonin as a radioprotective agent: a review. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 59 (3): 639–653.

Vijayalaxmi, Thomas C.R.Jr, Reiter R.J. & Herman T.S. 2002. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *Journal of Clinical Oncology*. 20: 2575-2601.

Vincent L., Cohen W., Delagrangre P., Boutin J.A. & Nosjean O. 2010. Molecular and cellular pharmacological properties of 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine (MCA-NAT): a nonspecific MT3 ligand. *Journal of Pineal Research*. 48 (3): 222–229.

Webley G.E. & Leidenberger F. 1986. The circadian pattern of melatonin and its positive relationship with progesterone in women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 63: 323–328.

Webley G.E. & Luck M.R. 1986. Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 78: 711–717.

Woo M.M.M., Tai C.J., Kang S.K., Nathwani P.M., Pang S.F. & Leung P.C.K. 2001. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 86 (10): 4789–4797.

Wiltbank M.C. & Ottobre J. 2003. Regulation of intraluteal production of prostaglandins. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1: 91–101.

Yie S.M., Niles L.P. & Younglai E.V. 1995. Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 80 (5):1747–1749.

Yuan J.H., Wang J.Z., Lan G.C., Sui H.S., Yu J.N. & Tan J.H. 2008. Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of steroid hormones during development of ovarian follicles in prepubertal goats. *Domestic Animal Endocrinology* 34 (4): 451–460.