



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

REBECA MAGALHÃES PEDROSA ROCHA

**EFEITO DA MELATONINA E SUA INTERAÇÃO COM O
HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS INCLUSOS EM FRAGMENTOS DE TECIDO
OVARIANO**

**FORTALEZA
2011**

REBECA MAGALHÃES PEDROSA ROCHA

EFEITO DA MELATONINA E SUA INTERAÇÃO COM O
HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS INCLUSOS EM FRAGMENTOS DE TECIDO OVARIANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo.

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Tavares de Matos

FORTALEZA

2011

XXXXX

Rocha, Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha

Efeito da melatonina e sua interação com o hormônio folículo estimulante sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos em fragmentos de tecido ovariano / Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha.
- Fortaleza, 2011.

XXp.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) –

Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Cultivo *in vitro*. 2. Folículos ovarianos. 3. Melatonina.

4. FSH. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.0824

REBECA MAGALHÃES PEDROSA ROCHA

EFEITO DA MELATONINA E SUA INTERAÇÃO COM O
HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS INCLUSOS EM FRAGMENTOS DE TECIDO OVARIANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 26/07/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo (Orientador)
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Profa. Dra. Maria Helena Tavares de
Matos (Co-orientadora)
Universidade Federal do Vale do São
Francisco – UNIVASF

Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva
(Examinadora)
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Dra. Edmara Chaves Costa (Examinadora)
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Aos meus pais, Francisco e Alana.

Dedico...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela capacitação profissional que me proporcionaram, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo concedido na forma de bolsa de estudo, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo auxílio financeiro dessa pesquisa.

Ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA) da UECE, por todo o suporte oferecido e aprendizagem durante a graduação e para execução do presente projeto.

À Deus, pela luz e força necessária ao longo dos anos para sempre seguir em frente. Por sempre me mostrar os melhores caminhos a seguir e por colocar pessoas maravilhosas nessa minha jornada.

Aos meus pais, Francisco de Assis Tavares Rocha e Alana Mara Magalhães Pedrosa Rocha, agradeço pelo amor incondicional, pela credibilidade, pelo exemplo de caráter e principalmente pelo apoio imensurável para que eu me mantivesse firme frente às adversidades da vida. Aos meus pais, sou grata por tudo o que sou e poderei ser e por essa conquista tão ímpar em minha vida que lhes dedico.

Aos meus irmãos, Sabrina Magalhães Pedrosa Rocha Pinheiro e Ismael Magalhães Pedrosa Rocha, cujos exemplos sempre busco seguir e por acreditarem em meu potencial, sempre me incentivando a lutar pelos meus sonhos. Pela união em todos os momentos e pela certeza de que sempre podemos contar uns com os outros.

Ao meu sobrinho, Lucas Rocha Pinheiro, cujo simples sorriso é capaz de alegrar um dia inteiro.

À minha avó, Cecília Magalhães Andrade Pedrosa, pelo exemplo de vida, pela presença em todos os momentos da minha vida e pelas palavras carinhosas de apoio.

Ao meu namorado, João Batista e Silva Júnior, por compartilhar todos os momentos, sejam eles alegres ou tristes. Pelas palavras diárias de apoio, incentivo e conforto durante as nossas curtas ligações no período em que estive fora e que foram

essenciais para que eu me mantivesse firme e determinada a prosseguir. Pela dedicação para me fazer uma pessoa mais feliz e principalmente pelo amor e carinho.

Às minhas grandes amigas Laritza Ferreira de Lima e Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves, companheiras desde a época da graduação, cuja amizade e companheirismo foram indispensáveis para que eu chegasse até aqui. Sou imensamente grata a Deus por colocar pessoas tão maravilhosas como vocês, meninas, em minha vida.

À amiga Patrícia Magalhães de Andrade, pelos ensinamentos de microtomia e pela companhia constante mesmo quando estava distante.

À família Fontenele, minha família em Brasília, por me receberem tão carinhosamente em suas casas e por me oferecerem suporte emocional que só uma família pode oferecer em momentos difíceis. Palavras não seriam suficientes para expressar a minha eterna gratidão a vocês, pessoas tão maravilhosas que tive o imenso prazer de conhecer.

Ao meu orientador, Professor José Ricardo de Figueiredo, pela oportunidade dada há seis anos quando dei os primeiros passos na iniciação científica. Pelos ensinamentos, orientação e principalmente pelo exemplo o qual almejo seguir.

À minha co-orientadora, Professora Maria Helena Tavares de Matos, cujos ensinamentos durante a iniciação científica despertaram o meu interesse pela pesquisa. Por todo apoio, pela amizade e pelo exemplo de profissionalismo e competência.

Ao Professor Cláudio Cabral Campello, por todos os conhecimentos compartilhados, pela disponibilidade e prestatividade.

À Professora Sônia Nair Bão e sua equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão da Universidade de Brasília (UnB), pela disponibilidade e suporte para a execução da análise ultraestrutural.

Às Professoras Isabel Bezerra Lima-Verde e Juliana Jales de Hollanda Celestino pela amizade e auxílio durante a execução deste projeto, além dos ótimos momentos compartilhados.

À Dra. Jamily Bezerra Bruno e às doutorandas Márcia Viviane Alves Saraiva e Roberta Nogueira Chaves pela solidariedade e ensinamentos compartilhados e por toda atenção dispensada no decorrer desse período. E em especial, à amiga Viviane, minha companheira de defesa, por toda a paciência e por compartilhar todos os momentos dessa fase tão importante.

Ao Dr. Cláudio Afonso Pinho Lopes pela ajuda e apoio durante as análises de microscopia eletrônica em Brasília.

A todos os membros LAMOFOPA, pela colaboração direta e indireta para a realização desse trabalho, pelo compartilhamento de idéias e exemplos de vida.

À banca examinadora, por ter aceitado prontamente o convite e, sobretudo pela sua prestimosa colaboração ao corrigir o presente trabalho.

“Não julgue cada dia pela colheita que fez, mas pelas sementes que plantou.”

Robert Louis Stevenson

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de melatonina isoladamente ou em associação com o hormônio folículo estimulante (FSH) sobre a viabilidade, ativação e crescimento *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais caprinos inclusos em fragmentos de tecido ovariano. Para tanto, fragmentos de córtex ovariano foram cultivados *in vitro* por um ou sete dias (a 39°C em estufa; 5% de CO₂ em ar) em α -MEM suplementado com diferentes concentrações de melatonina (100, 250, 500 e 1000 pg/ml) isoladamente ou em associação com 50 ng/ml de FSH. Antes e após o cultivo, os folículos pré-antrais foram analisados utilizando histologia clássica, microscopia eletrônica de transmissão e de fluorescência, e os folículos foram classificados em primordiais, transição, primários e secundários, bem como em normais ou atresicos. Além disso, os diâmetros oocitário e folicular também foram avaliados. Os resultados mostraram que, os tratamentos α -MEM⁺, FSH, 500 e 1000 pg/ml de melatonina, sendo esta última concentração sozinha ou associada ao FSH, mantiveram a percentagem de folículos normais equivalente ao controle fresco (79,31%) após sete dias de cultivo. Com relação à ativação folicular, com a progressão do período de cultivo de um para sete dias, observou-se um aumento significativo no percentual de folículos em desenvolvimento em todas as condições de cultivo, exceto quando os folículos foram cultivados na presença de 500 pg/ml de melatonina sozinha ou associada a 50 ng/ml de FSH. Além disso, a combinação de 1000 pg/ml de melatonina e FSH aumentou significativamente os diâmetros folicular e oocitário quando comparado ao controle cultivado (α -MEM⁺) e comparando os períodos de cultivo (um e sete dias). As análises ultraestrutural e de fluorescência confirmaram a integridade dos folículos cultivados na presença de melatonina (1000 pg/ml) e FSH após sete dias de cultivo. Desta forma, o presente estudo mostrou evidências da ação da interação de melatonina e FSH sobre a foliculogênese inicial em cabras, uma vez que promoveu o crescimento *in vitro* e manteve a viabilidade de folículos pré-antrais.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*. Folículos ovarianos. Melatonina. FSH.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of different melatonin concentrations alone or in combination with follicle-stimulating hormone (FSH) on viability, activation and *in vitro* growth of caprine preantral follicles enclosed in ovarian tissue. To this end, fragments of ovarian cortex were cultured *in vitro* for one or seven days (at 39 °C; in 5% CO₂ in a humidified incubator) in α -MEM supplemented with different concentrations of melatonin (100, 250, 500 and 1000 pg/ml) alone or in combination with 50 ng/ml of FSH. Before and after culture, the fragments were fixed and analysed by histology, transmission electron microscopy and fluorescent, and the follicles were classified as primordial, intermediate, primary and secondary, as well as normal or atretic. Moreover, the oocyte and follicle diameters were also evaluated. The results showed that only tissues cultured in α -MEM+ alone or supplemented with FSH alone, melatonin (500 and 1000 pg/ml) or the combination of FSH and melatonin (1000 pg/ml) maintained the percentages of normal preantral follicles similar to the fresh control (79.31%) after seven days of culture. With regard to follicular activation, with the progression of the culture period from one to seven days, we observed a significant increase in the percentage of developing follicles in all culture conditions except when follicles were cultured with 500 pg/ml of melatonin or its combination with FSH. In addition, the combination of 1000 pg/ml of melatonin plus FSH significantly increased follicular and oocyte diameters as compared with α -MEM+ alone and comparing the culture periods (one or seven days). The ultrastructural and fluorescent analyses confirmed the integrity of follicles cultured with 1000 pg/ml of melatonin plus FSH after seven days. In conclusion, the present study showed evidences of the interaction of melatonin and FSH on initial folliculogenesis in goats, once it promoted *in vitro* growth and maintained the viability of preantral follicles.

Keywords: *In vitro* culture. Ovarian follicles. Melatonin. FSH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Etapas envolvidas na biossíntese da melatonina. Precussores e enzimas participantes da síntese de melatonina em qualquer tipo celular.....	38
Figura 2	Estádios do desenvolvimento folicular nas fases pré-antral e antral.....	43
Figure 1	Histological sections (400 X) of ovarian fragments after periodic acid Schiff-hematoxylin staining showing morphologically normal (A) and degenerated (B) follicles after culture with 1000 pg/ml of melatonin plus 50 ng/ml of FSH for 7 days. O = Oocyte; Nu = oocyte nucleus; GC = granulosa cell.....	90
Figure 2	Percentages of primordial follicles in the fresh control (noncultured tissue) and 1 or 7 day cultured tissue in medium containing melatonin and/or FSH.....	91
Figure 3	Percentages of developing follicles in the fresh control (noncultured tissue) and 1 or 7 day cultured tissue in medium containing melatonin and/or FSH.....	92
Figure 4	Electron micrographs of ultrastructurally normal preantral follicles before (A, Original magnification x 10,000) and after (B-C) 7 days of culture in α -MEM+ supplemented with 1000 pg/ml of melatonin plus 50 ng/ml of FSH (B, original magnification x 12,000; C, original magnification x 20,000). Note in A and B the intact oocyte and nuclear membranes, nuclei with decondensed chromatin and granulosa cells with elongated nuclei and high nucleus-cytoplasm ratios. In C, note the vesicles and organelles, predominantly mitochondria, that are uniformly distributed in the cytoplasm. GC = granulosa cell, O = oocyte, Nu = oocyte nucleus, m = mitochondria.....	93

Figure 5 Assessment of the viability of caprine preantral follicles using fluorescent probes. A, B Treated preantral follicle cultured for 7 days in medium supplemented with 1000 pg/ml of melatonin and 50 ng/ml of FSH and classified as viable since cells were labeled with calcein AM (green fluorescence). C, D Preantral follicle cultured for 7 days in α -MEM alone and classified as nonviable since cells were positive for ethidium homodimer-1 (red fluorescence)..... 94

LISTA DE TABELAS

Table 1	Percentages of morphologically normal caprine preantral follicles in the fresh control (uncultured) and 1 or 7 day cultured tissue in medium containing melatonin and/or FSH.....	95
Table 2	Mean follicular diameter in the fresh control (noncultured tissue) and 1 or 7 day cultured tissue in medium containing melatonin and/or FSH.....	96
Table 3	Mean oocyte diameter in the fresh control (noncultured tissue) and 1 or 7 day cultured tissue in medium containing melatonin and/or FSH.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A4:	Androstenediona
AMH:	<i>Anti-müllerian hormone</i> (Hormônio anti-mülleriano)
ANOVA:	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
ASOMT:	Acetilserotonina O-metiltransferase
Bcl2:	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
BMP-15:	<i>Bone morphogenetic protein-15</i> (Proteína Morfogenética-15)
BSA:	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
cAMP:	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (Adenosina monofosfato cíclica)
CAPES:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Caspase-3:	<i>Cysteiny l aspartic acid protease 3</i>
cGMP:	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> (Guanosina monofosfato cíclico)
CNPq:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂ :	Dióxido de carbono
CYP11A, -17, 19:	Genes codificadores das enzimas envolvidas na biossíntese de esteróides
DABCO:	<i>1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane</i> (Octano do diazabicyclo 1,4 [2.2.2])
DNA:	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
DRY:	<i>Amino acids aspartic acid–arginine–tyrosine residue</i> (Resíduo de aminoácidos ácido aspártico-arginina-tirosina)
E2:	17β-estradiol
EGF:	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epidermal)
ERN:	Espécies reativas de nitrogênio
ERO:	Espécies reativas de oxigênio
ERY:	<i>Amino acids glutamic acid–arginine–tyrosine residue</i> (Resíduo de aminoácidos ácido glutâmico-arginina-tirosina)
FGF-2:	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i> (Fator de Crescimento Fibroblástico-2)
Fig.:	<i>Figure</i> (Figura)

FINEP:	Financiadora de Estudos e Projetos
FIV:	Fertilização <i>in vitro</i>
FOXO3:	<i>Forkhead box O3</i>
FSH:	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> (Hormônio Folículo Estimulante)
FUNCAP:	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
g:	Gravidade
GC:	<i>Granulosa cell</i> (Célula da granulosa)
GDF-9:	<i>Growth Differentiation Factor-9</i> (Fator de Crescimento e Diferenciação-9)
GLM:	<i>General linear models</i>
GnRH:	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i> (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas)
h:	Horas
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrogênio
HC:	Histologia Clássica
HHG:	Eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Gonadal
HOCl:	Ácido hipocloroso
IGF-I:	<i>Insulin like growth factor-1</i> (Fator de crescimento semelhante à insulina-1)
ITS:	<i>Insulin, Tranferrin and Selenium</i> (Insulina, Transferrina e Selênio)
KDa:	<i>Kilodalton</i> (quilo Dalton)
KL:	<i>Kit Ligand</i>
L:	Litro
LAMOFOPA:	Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-antrais
LH:	<i>Luteinizing hormone</i> (Hormônio luteinizante)
m:	<i>Mitochondria</i> (Mitocôndria)
M:	Molar

MEM:	<i>Minimum essencial medium</i> (Meio essencial mínimo)
MET:	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mg:	Miligramas
min:	<i>Minutes</i> (Minutos)
ml:	Mililitros
mm:	Milímetros
mM:	Milimolar
mm ³ :	Milímetros cúbicos
MOIFOPA:	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
mRNA:	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico mensageiro)
MT1, MT2:	Receptores de membrana para melatonina
MT3:	Receptor nuclear para melatonina
mUI:	Mili-unidades internacionais
NAT:	N-acetiltransferase
ng:	Nanogramas
nm:	Nanometros
NO:	Óxido nítrico
Nu:	<i>Oocyte nucleus</i> (Núcleo oocitário)
O:	<i>Oocyte</i> (Oócito)
O ₂ ⁻ :	Ânion superóxido
ONOO ⁻ :	Ânion peroxinitrito
P<0.05:	Probabilidade de erro menor do que 5%
P>0.05:	Probabilidade de erro maior do que 5%
P4:	Progesterona
pg:	Picogramas
pH:	Potencial Hidrogeniônico
PI3K:	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i> (Fosfatidilinositol 3-kinase)

PPGCV:	Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
PTEN:	<i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i> (Fosfatase e tensina homóloga com deleção no cromossomo 10)
RENORBIO:	Rede Nordeste de Biotecnologia
RNS:	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS:	<i>Reactive oxygen species</i>
RZR/ROR:	<i>Nuclear orphan receptor subfamily</i> (Superfamília de receptores nucleares órfãos)
SAS:	<i>Statistical analysis system</i> (Sistema de análise estatística)
SD:	<i>Standard deviation</i> (Desvio padrão)
SNK:	<i>Student-Newman-Keuls</i>
SOD:	Superóxido dismutase
T-5-H:	Triptofano-5-hidroxilase
TE:	Transferência de Embriões
TEM:	<i>Transmission electronic microscopy</i>
UECE:	Universidade Estadual do Ceará
USA:	<i>United States of America</i> (Estados Unidos da América)
α -MEM:	<i>Alpha minimum essential medium</i> (Meio essencial mínimo alfa)
α -MEM+:	<i>Supplemented Alpha minimum essential medium</i> (Meio essencial mínimo alfa suplementado)
μ g:	Microgramas
μ l:	Microlitros
μ m:	Micromêtros
μ M:	Micromolar
%:	<i>Percentage</i> (Porcentagem)
$\pm$:	Mais ou menos
$^{\circ}$ C:	Graus Celsius
5-HTD:	5-hidroxitriptofano descarboxilase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Ativação de folículos.....	22
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais.....	23
2.3 Sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	23
2.4 Importância da composição do meio para o desenvolvimento folicular <i>in vitro</i>	24
2.5 Hormônio Folículo Estimulante (FSH).....	25
2.6 Estado atual do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais.....	26
2.7 Técnicas para análise da sobrevivência e do desenvolvimento folicular após o cultivo <i>in vitro</i>	26
3 CAPÍTULO I – Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana.....	29
4 JUSTIFICATIVA.....	62
5 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	63
6 OBJETIVOS.....	64
6.1 OBJETIVO GERAL.....	64
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	64
7 CAPÍTULO II – Interação entre melatonina e hormônio folículo estimulante promove o desenvolvimento <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais caprinos.....	65
8 CONCLUSÕES.....	98
9 PERSPECTIVAS.....	99
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

Os recentes avanços obtidos pela aplicação de biotécnicas relacionadas à reprodução animal favorecem a multiplicação de animais economicamente atrativos, como os caprinos, criados para a produção de carne, leite e pele. Para o aumento da eficiência reprodutiva destes animais, a utilização de biotécnicas como a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA) vem contribuindo para um melhor entendimento da biologia ovariana e consequentemente para a maximização do aproveitamento do potencial oocitário.

O ovário das diferentes espécies mamíferas, como a espécie caprina, contém milhares de oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais (90% dos folículos ovarianos) e poucos destes folículos chegam ao estágio de folículo pré-ovulatório, sendo eliminados naturalmente por um processo denominado atresia (MCLAUGHLIN; MCIVER, 2009). Diante disso, a MOIFOPA surge como uma importante ferramenta para resgatar os folículos do ambiente ovariano, manter a sua sobrevivência, proporcionar o seu crescimento *in vitro* e permitir a aquisição da competência dos oócitos provenientes destes folículos. Além disso, o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* (ovário artificial) poderia aumentar a disponibilidade de oócitos fertilizáveis e trazer, no futuro, um maior impacto sobre a produção *in vitro* de embriões (FIGUEIREDO et al., 2007), uma vez que a obtenção de crias vivas a partir de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* somente foi possível em camundongas (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003; HASEGAWA et al., 2006).

Sabe-se que o crescimento dos folículos presentes no ovário mamífero é regulado por hormônios e fatores intra-ovarianos (FORTUNE, 2003) e a avaliação dos seus efeitos sobre o desenvolvimento folicular poderá contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos na foliculogênese inicial e no curso da atresia. Dentre as substâncias reguladoras da foliculogênese, podemos destacar o papel do hormônio da glândula pineal, melatonina, e sua interação com a gonadotrofina hormônio folículo estimulante (FSH). A presença de receptores para melatonina (KANG et al., 2009) e FSH (OKTAY; BRIGGS; GOSDEN, 1997) em células ovarianas, bem como a detecção de altos níveis de melatonina no fluido folicular (SHI et al., 2009) apoiam a hipótese de sua atuação no desenvolvimento folicular.

Para uma melhor compreensão deste trabalho, a revisão de literatura a seguir fará uma explanação sobre a foliculogênese pré-antral e uma atualização dos avanços

relativos ao cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais com ênfase na espécie caprina. Ainda será abordada a importância da melatonina para a reprodução animal, destacando as suas funções na fisiologia ovariana. Parte desta revisão deu origem ao artigo intitulado: “Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana”, o qual está submetido no periódico *Acta Veterinaria Brasilica*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ativação de folículos pré-antrais

Os gametas femininos são estocados no ovário na forma de folículos primordiais, que se encontram no ovário em estado de quiescência (FAIR, 2003). O crescimento de folículos primordiais é um aspecto fundamental da reprodução das fêmeas mamíferas, embora seja um processo ainda pouco compreendido. Para que estes folículos entrem em crescimento, é necessária a sua ativação, ou seja, a passagem dos folículos do *pool* de reserva ou quiescência para o *pool* de folículos em crescimento (transição, primário, secundário, terciário e/ou pré-ovulatório). A ativação do folículo quiescente é marcada pela retomada da proliferação das células da granulosa, a mudança na sua morfologia de pavimentosa para cúbica, bem como o aumento do volume do citoplasma e do núcleo do oócito (HIRSHFIELD, 1991). O controle do mecanismo de ativação é feito por fatores inibitórios, que mantêm o folículo primordial em estado de dormência, e estimulatórios, responsáveis pela promoção da sobrevivência e ativação destes folículos. Diversos estudos vêm sendo direcionados para a elucidação dos fatores moleculares envolvidos no padrão de sinalização da ativação (REDDY; ZHENG; LIU, 2010). Estudos com camundongas modificadas geneticamente mostram evidências da atuação da via de sinalização PI3K/PTEN na regulação da quiescência e sobrevivência de folículos primordiais (JOHN et al., 2008). Com relação aos fatores inibitórios, estudos têm demonstrado que moléculas como PTEN e FOXO3 e o hormônio Anti-Mülleriano (AMH) atuam diretamente na manutenção do estado de dormência dos folículos primordiais (REDDY et al., 2008). A deleção dos seus genes em modelos murinos promoveu ativação irreversível e prematura do *pool* de folículos primordiais. No tocante à sobrevivência de folículos primordiais, estudos em camundongas com deleção para os genes PI3K e PDK1 resultaram em degeneração prematura de folículos primordiais diretamente em seu estado de quiescência (MORA et al., 2004).

Sabe-se, no entanto, que o número de folículos primordiais que deixa o *pool* de folículos quiescentes é predeterminado e, que os fatores endócrinos (gonadotrofinas) e fatores intraovarianos (fatores de crescimento e peptídeos) controlam a ativação e o crescimento desses folículos (PICTON et al., 2008). Estudos *in vitro* demonstraram que fatores como Kit Ligand (KL), Fator de Crescimento Fibroblástico-2 (FGF-2) e o Fator de Crescimento Epidermal (EGF) promovem a ativação de folículos primordiais (ratas:

PARROT; SKINNER, 1999; cabras: MATOS et al., 2007a; CELESTINO et al., 2009). A ativação folicular continua assim que é iniciada, independentemente da fase do ciclo, idade e gestação (JEWGENOW; PITRA, 1993). A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na manutenção da quiescência de folículos primordiais é fundamental para a sua utilização como fonte de oócitos fertilizáveis.

2.2 Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

A compreensão das vias de regulação da ativação e do posterior crescimento de folículos pré-antrais é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficientes para evitar a grande perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*. Desta forma, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais destaca-se como importante ferramenta para estudar os mecanismos que controlam a foliculogênese e a atresia.

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, também conhecido como ovário artificial, é uma importante etapa da biotécnica de MOIFOPA. O objetivo desta biotécnica é criar um adequado sistema de cultivo *in vitro* que promova a sobrevivência, crescimento, maturação e posterior fecundação de oócitos oriundos de folículos pré-antrais. Desta forma, no futuro, a MOIFOPA poderá contribuir para a multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou em via de extinção através do fornecimento de um grande número de oócitos provenientes de um mesmo animal, os quais poderão ser destinados aos programas de produção *in vitro* de embriões ou clonagem e posterior transferência de embriões (FIGUEIREDO et al., 2008). Para alcançar tais objetivos, é essencial o desenvolvimento de um eficiente sistema de cultivo *in vitro* que contemple cada etapa do desenvolvimento folicular. Entretanto, alguns pontos devem ser considerados como o sistema de cultivo a ser empregado e a composição do meio de cultivo.

2.3 Sistemas de cultivo *in vitro*

Diversos sistemas de cultivo têm sido desenvolvidos no sentido de promover o crescimento e garantir a manutenção da viabilidade de folículos pré-antrais *in vitro*. Nestes sistemas de cultivo *in vitro*, os folículos ovarianos podem ser cultivados inclusive no próprio tecido ovariano (*in situ*) ou na forma isolada. O cultivo *in vitro* pode aliar ainda esses dois sistemas em dois passos, no qual primeiro é realizado o cultivo *in vitro* de folículos primordiais inclusive em fragmentos de tecido ovariano até o estágio de primário e secundário, seguido do isolamento destas categorias foliculares e seu

posterior cultivo na forma isolada até o estágio antral (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003; TELFER et al., 2008).

A pequena dimensão dos ovários de camundongos permite o seu cultivo *in vitro* na forma de órgão inteiro, permitindo estudar os fatores que afetam o processo de ativação folicular (FORTUNE, 2003). Por outro lado, em animais domésticos, devido às grandes dimensões dos ovários, não é possível utilizar este modelo. Para estes animais, o cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano, rico em folículos primordiais, tem sido realizado para o estudo da ativação e crescimento de folículos primários (caprinos: SILVA et al., 2004; bovinos: BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997; babuínos: WANDJI et al., 1997; humanos: HOVATTA et al., 1997). O cultivo *in situ* traz como vantagens a manutenção da integridade tridimensional dos folículos ovarianos e da sua interação com as células do estroma ovariano.

O cultivo de folículos isolados apresenta como vantagens a possibilidade do acompanhamento individual dos folículos durante o cultivo, além de favorecer melhor perfusão do meio para o folículo (ABIR et al., 2006). Este sistema pode ser realizado de forma bidimensional (EPPIG; SCHROEDER 1989; CORTVRINDT; SMITZ; VAN STEIRTEGHEM, 1996), na qual o folículo é cultivado diretamente sobre o suporte de plástico ou sobre uma matriz, ou ainda de forma tridimensional, na qual o folículo é incluso em uma matriz, como por exemplo, o colágeno (CARROLL; WHITTINGHAM; WOOD, 1991) e o alginato (WEST et al., 2007).

2.4 Importância da composição do meio para o desenvolvimento folicular *in vitro*

O desenvolvimento dos diversos sistemas de cultivo *in vitro* é essencial para a obtenção de resultados promissores no cultivo de folículos pré-antrais. Entretanto, um fator ainda limitante para o sucesso destes sistemas é a composição do meio de cultivo. Uma variedade de meios de base tem sido utilizada para o crescimento folicular em diferentes espécies, como Meio Essencial Mínimo (CORTVRINDT; SMITZ; VAN STEIRTEGHEM, 1996), Meio Waymouth (MURUVI et al., 2005) e Meio McCoy's (TELFER et al., 2008). Esses meios são normalmente ricos em componentes importantes para manutenção e crescimento folicular *in vitro* como eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos e vitaminas (PICTON et al., 2008). Estudos têm demonstrado que a adição de diferentes suplementos ao meio de cultivo, como piruvato, glutamina, hipoxantina e ITS (Insulina, Transferrina e Selênio), aumenta

o percentual de folículos morfologicamente normais e estimula o crescimento folicular (SILVA et al., 2004; DEMEESTERE et al., 2005).

Sinais endócrinos e fatores de crescimento produzidos por células do estroma ou por outros folículos podem exercer grande influência no desenvolvimento folicular. Assim, várias pesquisas têm investigado o efeito de hormônios e fatores de crescimento (FIGUEIREDO et al., 2007) no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Entretanto, hormônios como a melatonina e sua interação com o FSH ainda não foram testados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos, os quais terão destaque e serão descritos a seguir. Além disso, o capítulo I desta dissertação abordará uma revisão de literatura sobre a melatonina e seus possíveis efeitos ovarianos.

2.5 Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

O FSH está envolvido na proliferação e diferenciação das células da granulosa *in vitro*. Aparentemente, níveis basais de FSH são necessários para o desenvolvimento de pequenos folículos (VAN DEN HURK; BEVERS; BECKER, 1997). Existem hipóteses de que o número de folículos primordiais que deixa o *pool* de folículos quiescentes é predeterminado, e que o FSH age sobre o processo de ativação folicular (MATOS et al., 2007b; MAGALHÃES et al., 2009). A ligação do FSH é restrita às células da granulosa e resulta em uma variedade de reações, tais como a estimulação da proliferação destas células e a síntese de esteróides. Entretanto, estudos têm mostrado que folículos ovarianos pré-antrais conseguem se desenvolver, independente da ação do FSH.

Os receptores para o FSH se expressam nas células da granulosa a partir do estágio de folículos primários (OKTAY; BRIGGS; GOSDEN, 1997). Apesar dos receptores de FSH não estarem presentes em folículos primordiais, esta gonadotrofina pode exercer um efeito indireto sobre o desenvolvimento folicular inicial através da liberação de fatores parácrinos produzidos por folículos maiores ou pelas células do estroma ovariano (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Alguns trabalhos demonstraram que o FSH regula a expressão de vários fatores de crescimento, tais como KL, Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9) e Proteína Morfogenética-15 (BMP-15), que têm um papel importante na ativação e no posterior crescimento folicular (THOMAS et al., 2005).

Outros autores demonstraram que o FSH pode promover o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais e a formação de antro em camundongas (SPEARS et al., 1998), ratas (MCGEE et al., 1997), mulheres (WRIGHT et al., 1999), vacas

(GUTIERREZ et al., 2000), cabras (ZHOU; ZHANG, 2005), ovelhas (CECCONI et al., 1999) e porcas (MAO et al., 2002). Recentemente foi demonstrado em ovinos (ANDRADE et al., 2005) e caprinos (MATOS et al., 2007b; MAGALHÃES et al., 2009) que a adição de FSH ao meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é importante para a manutenção da viabilidade e para promover a ativação e o crescimento folicular. Além disso, a adição de FSH de modo sequencial ao meio de cultivo de folículos pré-antrais caprinos isolados permitiu a obtenção de embriões (SARAIVA et al., 2010).

2.6 Estado atual do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

É indiscutível que grandes progressos já tenham sido observados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. No tocante ao desenvolvimento de folículos primários e secundários isolados, em algumas espécies como em felinos (JEWGENOW; STOLTE, 1996) e em marsupiais (BUTCHER; ULLMAN, 1996), foi observado o crescimento folicular após o cultivo *in vitro*, porém sem a formação de antro. Nas espécies bovina (GUTIERREZ et al., 2000) e humana (ROY; TREACY, 1993), folículos secundários isolados desenvolveram-se *in vitro* até o estágio antral. Em suínos, bubalinos, ovinos e caprinos, folículos secundários crescidos *in vitro* produziram oócitos maduros que foram posteriormente fecundados *in vitro* resultando em produção embrionária (WU; EMERY; CARREL, 2001; GUPTA et al., 2008; ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010; SARAIVA et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2011a).

Embora o grande avanço no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais com as espécies supracitadas, os resultados mais satisfatórios têm sido observados em animais de laboratório. CARROLL et al. (1990) obtiveram o nascimento de camundongos após criopreservação, crescimento, maturação e fecundação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos primários. Os melhores resultados foram observados por O'BRIEN et al. (2003) que obtiveram o nascimento de 53 camundongos a partir de folículos primordiais desenvolvidos, maturados e fecundados *in vitro*. Apesar desses resultados, o rendimento referente à produção de oócitos maduros a partir de folículos pré-antrais é extremamente baixo e variável devido à inadequação dos meios de cultivo disponíveis.

2.7 Técnicas para análise da sobrevivência e do desenvolvimento folicular após o cultivo *in vitro*

A avaliação da qualidade folicular após o cultivo *in vitro* pode ser realizada por diferentes técnicas. Dentre elas, podemos destacar a histologia clássica (HC), a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia de fluorescência.

A HC é uma importante técnica de análise folicular após cultivo *in vitro*, pois além de permitir uma análise quantitativa, ou seja, de um grande número de folículos cultivados, permite ainda verificar a mudança na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cúbica, por ocasião da ativação folicular, além de analisar a integridade morfológica do oócito e das células da granulosa. Tal técnica permite, portanto a classificação dos folículos quanto ao seu estágio de desenvolvimento (primordial, intermediário, primário ou secundário), e ainda quanto às suas características morfológicas (normais ou atresicos). Entretanto, a HC possui como desvantagens não permitir a avaliação da integridade das membranas plasmática e nuclear e das organelas citoplasmáticas. Vale salientar que tal técnica pode ser realizada tanto em folículos isolados, como naqueles inclusos em fragmentos de córtex ovariano (MATOS et al., 2007c).

A MET é considerada uma técnica qualitativa e acurada, capaz de permitir a avaliação da integridade de membranas celulares e organelas citoplasmáticas (SALEHNIA; MOGHADAM; VELOJERDI, 2002). Ela se mostra como uma ferramenta valiosa para detectar modificações morfológicas iniciais devido à atresia, as quais podem ser observadas apenas em nível ultraestrutural, antes de se tornarem mais visíveis e possíveis de serem identificadas por microscopia óptica. Tal técnica é, portanto, capaz de verificar a qualidade do oócito e das células da granulosa (LUCCI et al., 2001; LOPES et al., 2009). Com esta técnica, é possível ainda avaliar a atresia, ou seja, a morte do folículo tanto por apoptose (STALDEMANN; LASSMAN, 2000) como pelo processo degenerativo de necrose (MARTINEZ-MADRID et al., 2007).

Outra técnica empregada para avaliar a viabilidade folicular após o cultivo *in vitro* é a microscopia de fluorescência, a qual utiliza marcadores fluorescentes, que quando excitados com radiação de baixo comprimento de onda, absorvem energia e emitem luz de comprimento de onda maior (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). A microscopia de fluorescência é considerada uma técnica confiável, prática e rápida (CORTVRINDT; SMITZ, 2001; LOPES et al., 2009). Recentemente, estudos vêm sendo realizados empregando a técnica de fluorescência para avaliar a viabilidade folicular após o cultivo *in vitro* (ROSSETTO et al., 2009; SILVA et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2011b). Nesses trabalhos, os folículos foram analisados por

fluorescência com base na detecção simultânea de células vivas e mortas marcadas por calceína-AM e pelo etídio homodímero-1, respectivamente. Enquanto a primeira sonda detecta atividade da esterase intracelular, enzima característica de células viáveis, a outra cora ácidos nucleicos em células não-viáveis, com ruptura na membrana plasmática (LOPES et al., 2009).

Em adição às técnicas de avaliação da sobrevivência folicular após cultivo *in vitro*, foram desenvolvidos métodos de análise do início do crescimento de folículos primordiais através da utilização de marcadores de atividade proliferativa celular (WANDJI; EPPIG; FORTUNE, 1996). Dentre os marcadores mais utilizados, podemos citar bromo-deoxiuridina (BrdU), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e timidina- H^3 . O BrdU é um marcador não-radioativo para a síntese de DNA *in vitro*. A incorporação de BrdU ao DNA das células na fase S do ciclo celular pode ser utilizada como um indicador de atividade proliferativa (JEWGENOW, 1998). O PCNA também é um marcador expresso em células em crescimento e proliferação, entretanto este antígeno é uma proteína auxiliar da DNA polimerase delta, que está envolvida no processo de reparo do DNA (DOWNEY; TAN; SO, 1990). Já a timidina- H^3 é um marcador radioativo normalmente utilizado para determinar a atividade proliferativa de células da granulosa e da teca (MATOS et al., 2007c).

O crescimento e a diferenciação dos folículos cultivados *in vitro* também podem ser refletidos pela secreção de esteróides. Considerando o seu pequeno tamanho, os folículos secretam relativamente grandes quantidades de esteróides, tais como o estrógeno e a progesterona (LIU et al., 2001). Em geral, a produção esteroidogênica ao final do cultivo pode ser detectada por radioimunoensaio, através do meio coletado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise.

3 CAPÍTULO I

Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana

(Melatonin and animal reproduction: implications on ovarian physiology)

Periódico: *Acta Veterinaria Brasilica* (Submetido em abril de 2011)

Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana

(Melatonin and animal reproduction: implications on ovarian physiology)

Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha^{1*}, 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 Veterinária (FAVET), Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais (LAMOFOPA), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, Brazil,

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

*Corresponding address:

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV)

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA)

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi.

Fortaleza – CE – Brasil. CEP: 60740-000

Tel.: +55.85.3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840

E-mail address: rebeca_mpr@yahoo.com.br (Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha)

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/escuridão, 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 e 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 correspond 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 sazonal 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.

Key words: photoperiod, folliculogenesis e 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 camundongas (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 ratazanas 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 *feed-back* 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. Sequencialmente, 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.

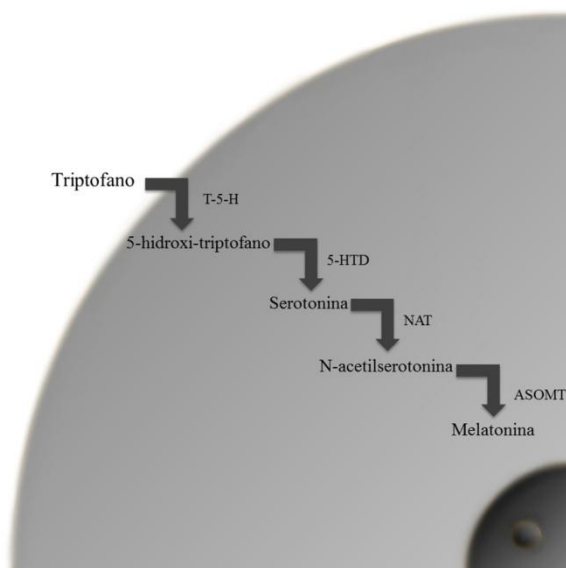


Figura 1. Etapas envolvidas na biossíntese da melatonina. Precusores e enzimas participantes da síntese de melatonina em qualquer tipo celular.

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 (Rönnberg 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 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 G_i : 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 & Leidenberger, 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 ($NO^\cdot$), 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 & Tan, 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* acelular, 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 peroxil, 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), glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase (Tamura et al., 2008). Estudos têm mostrado que a melatonina melhora os níveis intracelulares de glutathione por estimular a enzima limitante de sua biossíntese, γ -glutamylcysteine synthetase. Baydas et al. (2002) encontraram que uma deficiência de melatonina induzida por uma pinealectomia reduzia a atividade da glutathione 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 FISIOLÓGIA 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.

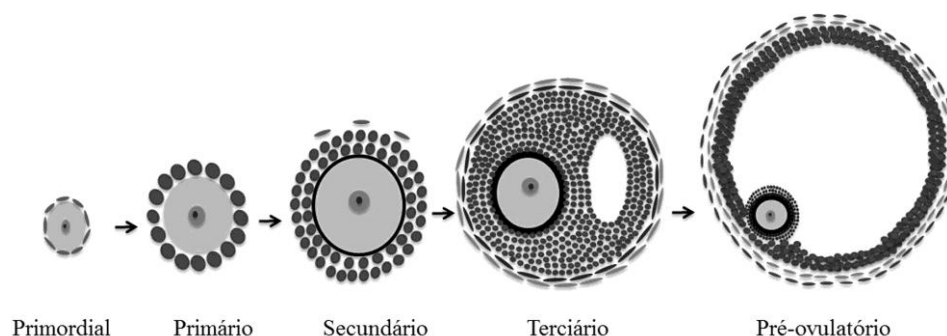


Figura 2. Estádios do desenvolvimento folicular nas fases pré-antral e antral.

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 camundongas cultivados por 12 dias, enquanto a adição de doses elevadas deste hormônio (2 mM) foi tóxica aos folículos, diminuindo a viabilidade 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 μ g) 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 17 β -estradiol (E₂). 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 P₄, A₄ e E₂, 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 P₄) 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 P₄ em células da granulosa de ratas (Fiske et al., 1984), vacas (Webley & Luck, 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 P₄ e A₄ 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 P₄ em células da granulosa nesta mesma espécie.

Com relação à produção de E₂, alguns estudos têm sugerido um efeito estimulatório da melatonina na produção de E₂ em células da granulosa de suínos e humanos (Yie et al., 1995; Sirotkin, 1994). Entretanto, a maioria dos estudos não demonstra efeitos estimulatórios da melatonina em células da granulosa de mulheres (Brzezinski et al., 1992), vacas (Webley & Luck, 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 O₂ (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 P₄ 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 P_4 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 P_4 em células luteinizantes (Schaeffer & Sirotkin, 1997).

Fatores bioquímicos e endócrinos como prostaglandina $F-2\alpha$, oxitocina e ERO suprimem a produção de P_4 em células luteais (Wiltbank & Ottobre, 2003; Stormshak, 2003). A prostaglandina $F-2\alpha$ 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 $F-2\alpha$ do útero de ratas, sugerindo sua atuação na função luteal e manutenção da produção de P_4 (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 BIBLIOGRÁFICAS

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. & Markowska M. 2005. Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. *Endocrine*. 27 (2): 101–110.
- 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.
- 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 recrudescence 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.

Malpaux 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., Anhê 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 peroxy 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.
- Rönnerberg 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.

Slaugenhaupt S.A., Roca A.L., Liebert C.B., Altherr M.R., Gusella J.F. & Reppert S.M. 1995. Mapping of the gene for the Mel1a-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.

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

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.

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.

4 JUSTIFICATIVA

A MOIFOPA é uma biotécnica que permite a recuperação de dezenas a milhares de folículos pré-antrais a partir de um único ovário, com o intuito de evitar a grande perda folicular que, normalmente, ocorre *in vivo*. Uma vez recuperados, tais folículos poderiam então ser utilizados em programas de produção *in vitro* e transferência de embriões e/ou criopreservação.

No entanto, para que estes folículos possam entrar em fase de crescimento, é preciso que sejam ativados, ou seja, retomem a proliferação das células da granulosa, bem como aumentem os volumes citoplasmático e nuclear do oócito. Neste contexto, sabendo-se da grande importância econômica que a espécie caprina representa para o Nordeste brasileiro, sendo esta uma importante fonte de carne, leite e pele, é essencial o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* capaz de ativar esses folículos e assegurar seu posterior crescimento, otimizando o aproveitamento do potencial oocitário desses animais e incrementando a eficiência da reprodução animal. Além disso, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente poderá fornecer subsídios para uma melhor compreensão acerca dos fatores que regulam a foliculogênese na fase pré-antral.

Estudos referentes aos fatores e mecanismos envolvidos na regulação e ativação dos folículos primordiais são escassos, especialmente em animais de produção, como caprinos. Neste contexto, diversos autores têm investigado o efeito de vários componentes no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais tanto de animais de laboratórios como animais domésticos como vaca, cabra, ovelha. Substâncias como soro fetal, FSH, estradiol, EGF são largamente utilizadas. Entretanto, os efeitos de diferentes concentrações de melatonina, a qual tem mostrado ter influência sobre a biologia ovariana, bem como a sua possível interação com o FSH, hormônio extremamente importante para foliculogênese, não foram testados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Para este fim, além da técnica de histologia clássica, serão empregadas análises mais acuradas como a microscopia de fluorescência e a microscopia eletrônica de transmissão (MET), a fim de assegurar a qualidade de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* e, conseqüentemente, melhor avaliar a eficiência dos meios de cultivo testados.

5 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Diante do exposto, formulou-se a seguinte hipótese:

- 1) Melatonina, isoladamente ou em associação com o FSH, mantém a viabilidade, influencia positivamente a ativação e o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos em fragmentos de tecido ovariano.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL:

- Estudar o efeito da melatonina isoladamente ou em associação com o FSH sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos *in situ*.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estabelecer a curva concentração-resposta de melatonina tendo como parâmetros a viabilidade, a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais caprinos;
- Verificar o efeito da melatonina isoladamente ou em associação com o FSH, sobre a viabilidade, a ativação e o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos;
- Analisar a morfologia, a ultraestrutura, bem como a viabilidade dos folículos pré-antrais caprinos *in situ* cultivados *in vitro* com melatonina e FSH.

7 CAPÍTULO II

Interação entre Melatonina e Hormônio Folículo Estimulante promove desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos

Interaction between Melatonin and Follicle-Stimulating Hormone Promotes *in vitro*
Development of Caprine Preantral Follicles

Periódico: *Animal Reproduction Science* (Submetido em maio de 2011)

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da melatonina e hormônio folículo estimulante (FSH) sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Fragmentos ovarianos foram cultivados por um ou sete dias em Meio Essencial Mínimo- α (α -MEM+) contendo melatonina (100, 250, 500 e 1000 pg/ml), FSH (50 ng/ml), ou uma combinação dos dois hormônios, e foram posteriormente analisados por histologia clássica, microscopia eletrônica de transmissão e de fluorescência. Os resultados mostraram que após sete dias de cultivo, somente os tecidos ovarianos cultivados em α -MEM+ sozinho ou suplementado com FSH, melatonina (500 and 1000 pg/ml), ou uma combinação de FSH e melatonina (1000 pg/ml) mantiveram os percentuais de folículos pré-antrais normais similares ao controle fresco. Em comparação com o tecido não-cultivado, os percentuais de folículos em desenvolvimento foram significativamente superiores em todas as condições de cultivo após sete dias. A adição de 1000 pg/ml de melatonina associada ao FSH ao meio de cultivo aumentou significativamente os diâmetros folicular e oocitário em comparação ao α -MEM+ sozinho após sete dias de cultivo. As análises ultraestrutural e de fluorescência confirmaram a integridade dos folículos cultivados com 1000 pg/ml de melatonina e FSH após sete dias. Dessa forma, este estudo demonstrou que a interação entre melatonina e FSH manteve a integridade ultraestrutural e estimula o crescimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados.

Palavras-chave: Cabra. Folículo pré-antral. Melatonina. Hormônio Folículo Estimulante.

Interaction between Melatonin and Follicle-Stimulating Hormone Promotes *in vitro*
Development of Caprine Preantral Follicles

R. M. P Rocha^{a*}, L. F. Lima^a, A. M. C. V. Alves^a, J. J. H. Celestino^b, M. H. T. Matos^c,
I. B. Lima-Verde^d, C. A. P. Lopes^a, S. N. Bão^e, C. C. Campello^a, A. P. R. Rodrigues^a, J.
R. de Figueiredo^a

^a Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Manipulation of Oocyte and Preantral Follicles (LAMOFOPA), State University of Ceara, Avenue Parajana 1700, 60740-000, Fortaleza-CE, Brazil

^b International Integration of Lusophone African-Brazilian University, Avenue Abolição 3, 62.790-000, Redenção-CE, Brazil

^c Nucleus of Biotechnonology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, José de Sá Maniçoba Street S/N, 56.304-917, Petrolina-PE, Brazil

^d Institute for Technology and Research, University Tiradentes, Avenue Murilo Dantas 300, 49032-490, Aracaju-SE, Brazil

^e Laboratory of Electron Microscopy, Department of Cell Biology, University of Brasilia, 70910-900, Brasilia, Brazil

*Corresponding address:

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV)

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA)

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi.

Fortaleza – CE – Brasil. CEP: 60740-000

Tel.: +55.85.3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840

E-mail address: rebeca_mpr@yahoo.com.br (Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha)

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of melatonin and follicle-stimulating hormone (FSH) on the *in vitro* culture of goat preantral follicles. Ovarian fragments were cultured for one or seven days in α -Minimum Essential Medium (α -MEM+) containing melatonin (100, 250, 500 or 1000 pg/ml), FSH (50 ng/ml), or a combination of the two hormones and further analyzed by histology, transmission electron and fluorescent microscopy. The results showed that after seven days of culture, tissues cultured in α -MEM+ alone or supplemented with FSH alone, melatonin (500 and 1000 pg/ml) or the combination of FSH and melatonin (1000 pg/ml) maintained percentages of normal preantral follicles similar to the fresh control. In contrast to noncultured tissues, the percentage of developing follicles was significantly increased in all culture conditions after seven days. The addition of 1000 pg/ml melatonin plus FSH to the culture media significantly increased follicular and oocyte diameters as compared with α -MEM+ alone after seven days of culture. Ultrastructural and fluorescent analyses confirmed the integrity of follicles cultured with 1000 pg/ml of melatonin plus FSH for seven days. In conclusion, this study demonstrated that the interaction between melatonin and FSH maintains ultrastructural integrity and stimulates further growth of cultured caprine preantral follicles.

Keywords: Goat, Preantral follicles, Melatonin, Follicle-stimulating hormone

1. Introduction

Mammalian folliculogenesis is a complex process that involves changes in follicular morphology i.e., oocyte growth and granulosa cell differentiation (Cortvrindt and Smitz, 2001). Understanding the factors that initiate and control preantral follicle development (primordial, primary and secondary follicles) is an important step towards the establishment of an *in vitro* culture system that allows activation and development to later stage follicles. The factors and mechanisms involved in early folliculogenesis have not been fully elucidated. However, it is known to require growth factors and hormones (Fortune, 2003) such as gonadotropins and melatonin.

Among the gonadotropins, follicle-stimulating hormone (FSH) is known for its role in follicular development. FSH binding to its receptors in granulosa cells results in several effects, including cell proliferation and steroid secretion. Although its receptors are not expressed in primordial follicles, FSH has important roles in early follicular development through the regulation of the production of growth factors such as kit ligand (KL) and bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) (Thomas et al., 2005). Matos et al. (2007) showed the maintenance of ultrastructural integrity and follicular growth after seven days of *in vitro* culture of caprine ovarian tissue in the presence of 50 ng/mL of FSH.

Another hormone that is important in reproductive physiology, especially in regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in photoperiodic species, is melatonin (Wehr et al., 2001). Melatonin is produced by the pineal gland and by various other organs such as the ovary (El-Raey et al., 2011; Itoh et al., 1999). This hormone has important physiological roles and is important in sleep and temperature regulation, metabolism, circadian and seasonal rhythmicity (Jan et al., 2009). Recently it was demonstrated that in addition to the multiple actions of melatonin on a number of

physiological processes, melatonin also plays an important role as an indirect antioxidant and powerful free radical scavenger (Rodríguez et al., 2004; Tomás-Zapico et al., 2005). Furthermore, two distinct melatonin receptor types (MT1 and MT2) have been identified in animal species (Carcangiu et al., 2009; Pandi-Perumal et al., 2008). The presence of high melatonin levels in women follicular fluid (Brzezinski et al., 1987; Rönnberg et al., 1990) and the presence of its receptors in rat and mouse granulosa cells (Lee et al., 2001; Soares et al., 2003) suggest a potential role of melatonin in ovarian function.

Adriaens et al. (2006) showed that *in vitro* culture of isolated mice secondary follicles in FSH (10 mUI/ml) and melatonin (100 μ M) altered steroidogenesis, with a significant increase in androstenedione and progesterone production. However, there have been no reports on the effects of different melatonin concentrations on caprine preantral follicles cultured *in vitro*, a species of great economic importance to the northeast region of Brazil. Therefore, the aim of this study was to verify whether physiological concentrations of melatonin alone or in association with FSH have beneficial effects on the survival, activation and growth of caprine preantral follicles cultured *in vitro* for one or seven days.

2. Materials and Methods

2.1. Source of ovaries

Ovarian cortical tissues (n=10 ovaries) were collected at a local slaughterhouse from five adult (1 – 3 years old) mixed-breed goats (*Capra hircus*). Immediately postmortem, the ovaries were washed in 70% alcohol for 10 seconds and then two times in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 100 μ g/mL penicillin and

100 µg/mL streptomycin. Pairs of ovaries were transported within 1 hour to the laboratory in MEM at 4 °C (Chaves et al., 2008).

2.2. Experimental protocol

All chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise indicated. Our organ culture system was described in detail previously (Matos et al., 2007). Briefly, ovarian tissue samples from each ovarian pair were cut into 21 slices (3 mm x 3 mm x 1 mm) using a needle and scalpel under sterile conditions. The tissue pieces were then either directly fixed for histological and ultrastructural analysis (noncultured/fresh control) or placed in culture for one or seven days. Caprine tissues were transferred to 24-well culture dishes containing 1 ml of culture media. Culturing was performed at 39 °C in 5% CO₂ in a humidified incubator, and the media were incubated for 1 h prior to use. The basic culture medium (cultured control) consisted of α -MEM (pH 7.2 – 7.4) supplemented with ITS (insulin 10 µg/mL, transferrin 5.5 µg/mL and selenium 5.0 ng/mL), 0.23 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, and 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA), which we call α -MEM+. For the experimental conditions, the medium was supplemented with melatonin at different concentrations (100, 250, 500 or 1000 pg/ml), FSH (50 ng/ml, porcine FSH, Stimufol[®], FSH:LH = 20:1, donated by Dr. J.F. Beckers, Liège, Belgium) or a combination of the two substances. Each treatment was replicated five times, and the culture media was replenished every other day. The concentration of FSH used in this work was chosen based on a previous study (Matos et al., 2007), and the concentrations of melatonin (100 – 1000 pg/ml) used were similar to physiological concentrations observed in goats (Alila-Johansson et al., 2001).

2.3. Morphological analysis and assessment of *in vitro* follicular growth

Before culturing (fresh control) or after one or seven days in culture, all the tissues were fixed in Carnoy's solution for 12 h and then dehydrated in increasing concentrations of ethanol. After paraffin embedding (Synth, São Paulo, Brazil), the caprine tissue pieces were cut into 7 μ m sections, and every section was mounted on glass slides and stained by Periodic Acid Schiff hematoxylin. Follicle stage and survival were assessed microscopically on serial sections. Coded anonymized slides were examined by microscopy (Nikon, Japan) at 400X magnification.

The developmental stages of follicles have been defined previously as follows (Silva et al. 2004): primordial (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte) or growing follicles (intermediate: one layer of flattened to cuboidal granulosa cells; primary: one layer of cuboidal granulosa cells, and secondary: two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte). These follicles are classified individually as histologically normal when an intact oocyte is present and surrounded by granulosa cells that are well organized in one or more layers and have no pyknotic nuclei (fig. 1a). Atretic follicles were defined as those with a retracted oocyte, pyknotic nucleus, and/or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane (fig. 2b). Overall, 150 follicles were evaluated for each treatment (30 follicles per treatment in one repetition x 5 repetitions = 150 follicles), totaling 3,150 preantral follicles.

To evaluate follicular activation, the percentages of healthy primordial and growing follicles were calculated before (fresh control) and after culturing in each medium. In addition, follicle and oocyte diameters were measured only in healthy follicles. Follicle diameter was recorded from edge to edge of the granulosa cell membrane or from the outside edge of the theca cell layer when present. Oocyte diameter was recorded from edge to edge of the oocyte membrane. Two perpendicular diameters were recorded for each, and the average of these two values are reported as

follicle and oocyte, respectively. Care was taken to count each follicle only once, as in our earlier studies (Matos et al., 2007). Each follicle was examined in every section in which it appeared and matched with the same follicle on adjacent sections to avoid double counting, thus ensuring that each follicle was only counted once, regardless of its size.

2.4. Ultrastructural analysis

For a better evaluation of follicular morphology, ultrastructural studies were performed on fragments of fresh control and treatment groups with the best results obtained from histological analysis after seven days of culture. Small pieces (1 mm³) of caprine ovarian tissues were fixed in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 4 h at room temperature. After fixation, fragments were post-fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h. Subsequently, the samples were dehydrated through a gradient of acetone solutions, and the tissues were embedded in Spurr. Semi-thin sections (3 µm) were cut on an ultramicrotome (Reichert Supernova, Heidelberg, German) for light microscopy studies and stained with toluidine blue. The ultra-thin sections (60–70 nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined under a Jeol 1011 (Jeol, Tokyo, Japan) transmission electron microscope. Parameters such as density and integrity of ooplasmic and granulosa cell organelles, vacuolization and integrity of basement, oocyte and nuclear membranes were evaluated.

2.5. Assessment of preantral follicles by fluorescence viability assay

A viability study similar to the morphological investigation was performed to analyze the effects of caprine ovarian tissue culture on the viability of preantral follicles.

Based on the results of the morphological and ultrastructural analysis, the viability of follicles cultured with the concentration of melatonin with or without FSH that resulted in the best outcome was further analyzed using fluorescent probes. Additional pairs of ovaries ($n = 3$) were cut into fragments, one of which was immediately processed for follicle isolation (fresh control). The remaining fragments were cultured as described previously and then submitted to isolation. Fragments were processed for mechanical isolation using the method described by Lucci et al. (1999). Preantral follicles were analyzed using a two-color fluorescence cell viability assay based on the simultaneous detection of live and dead cells with calcein-AM and ethidium homodimer-1, respectively. While the first probe detects intracellular esterase activity in viable cells, the latter labels nucleic acids in non-viable cells with plasma membrane disruption. The test was performed by adding 4 μM calcein-AM and 2 μM ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) to a suspension of isolated follicles and incubating them at 37°C for 15 min. After labeling, follicles were washed once by centrifugation at 100 $\times$ g for 5 min and resuspended in MEM. Cells were then mounted on glass microscope slides in 5 μl anti-fading medium (DABCO, Sigma, Deisenhofen, Germany) to prevent photobleaching and examined using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i, Tokyo, Japan). The fluorescent signals from calcein-AM and ethidium homodimer-1 were collected at 488 and 568 nm, respectively. Oocytes and granulosa cells were considered viable if their cytoplasm was positive for calcein-AM (green) and their chromatin was negative for ethidium homodimer-1 (red).

2.6. Statistical analysis

Percentages of morphologically normal, primordial and developing follicles after one or seven days culture were initially subjected to Smirnov-Kolmogorov and Batlett tests to confirm normal distribution and homogeneity of variance, respectively. Analysis

of variance (ANOVA) test was then carried out using the GLM procedure of SAS (1997), and the Dunnett test was applied for comparison of each treatment tested against the control groups (Control and MEM+). The student's Newman Keuls (SNK) test was used to evaluate the effects of different concentrations of melatonin and days of culture. In all cases, differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$, and the results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD).

3. Results

Caprine Preantral Follicle Survival after Culture

The percentages of morphologically normal preantral follicles in noncultured tissues (control) and after one or seven days of culture are shown in table 1. After one day of culture, we observed that all treatments resulted in similar percentages of morphologically normal follicles to fresh control. However, after seven days of culture, only tissues cultured in α -MEM+ alone, supplemented with FSH alone, melatonin (500 and 1000 pg/ml) or the combination of FSH and melatonin (1000 pg/ml) resulted in percentages of normal preantral follicles similar to the fresh control (79.31%). At day seven, all treatments resulted in a percentage of normal follicles similar to that observed after one day of culture.

Activation of Caprine Preantral Follicles after Culture

Figures 2 and 3 show the percentage of primordial and growing follicles, respectively, in ovarian cortical tissue before and after *in vitro* culturing. Fresh ovarian tissues predominantly contained primordial (55.88%) and developing (44.12%) follicles. In all culture conditions, after seven days of culture, a significant reduction in

the percentage of primordial follicles was observed concomitant with an increase ($p < 0.05$) in the percentage of developing follicles compared to the fresh control. The addition of melatonin to the tissues had no effect on the percentage of developing follicles when compared to tissues cultured in α -MEM+ alone ($p > 0.05$). With the progression of the culture period from one to seven days, we observed a significant increase ($p < 0.05$) in the percentage of developing follicles in all culture conditions, except when follicles were cultured with 500 pg/ml of melatonin or its combination with FSH.

In vitro Growth of Caprine Preantral Follicles

Follicle and oocyte diameters were measured and are shown in tables 2 and 3, respectively. After one or seven days of culture for all treatments, mean follicular and oocyte diameters were similar to uncultured control tissue ($p < 0.05$). However, after one day of culture, a significant reduction in oocyte diameter was observed when tissues were cultured in 250 pg/ml of melatonin and FSH compared to the fresh control. After seven days of culture, the combination of 1000 pg/ml of melatonin and 50 ng/ml of FSH increased ($p < 0.05$) follicular and oocyte diameters when compared to α -MEM+ alone. When comparing the culture periods (one or seven days), only treatment with melatonin (1000 pg/ml) and FSH significantly increased follicular and oocyte diameters.

Ultrastructural Features of Caprine Preantral Follicles

To better evaluate follicular integrity, ultrastructural analysis was carried out on fresh tissues and tissues cultured for seven days with 1000 pg/ml of melatonin plus 50 ng/ml of FSH, the treatment that yielded the best results according to the previous histological analysis (survival and growth of caprine preantral follicles). The follicles from fresh control tissue (fig. 4a) and tissue cultured for 7 days with melatonin and FSH

(fig. 4b, c) exhibited large oocytes, intact basement and nuclear membranes, nuclei with decondensed chromatin, and uniform distribution of vesicles and organelles such as smooth and rough endoplasmic reticula. Granulosa cells were normal, with elongated nuclei and a high nucleus-cytoplasm ratio. In addition, both rounded and elongated mitochondria were the most predominant organelles observed in oocytes and granulosa cells.

Assessment of follicle viability after culture

Based on the morphological and ultrastructural results, a viability assay was performed using isolated follicles from fresh controls and ovarian fragments cultured for seven days in α -MEM+ alone or supplemented with 1000 pg/ml of melatonin plus 50 ng/ml of FSH. The ultrastructural results were confirmed by fluorescent analysis, which showed viable follicles with oocyte and granulosa cells stained in green with calcein-AM in the fresh control and in preantral follicles cultured for 7 days in 1000 pg/ml of melatonin with FSH (fig. 5b). In contrast, degenerated follicles were labeled with ethidium homodimer-1 (red fluorescence) after 7 days of culture in α -MEM+ alone (fig. 5d).

4. Discussion

Recent studies have shown advances in *in vitro* culture of ovarian follicles. The research has focused on identifying the regulatory pathways that operate within the ovarian microenvironment and contribute to ovarian reproductive competence. In this context, the hypothesis that melatonin may control the initiation of follicular development was developed. The present study demonstrated for the first time the effects of melatonin plus FSH on the survival, activation and growth of caprine preantral follicles cultured *in vitro* for one or seven days. It is important to emphasize

that the melatonin concentrations (100 – 1000 pg/ml) used are similar to physiological concentrations observed in goats (Alila-Johansson et al., 2001) and were used in granulosa cell culture (Nakamura et al., 2003).

In our study, culturing caprine ovarian tissue for seven days in α -MEM alone or supplemented with melatonin, FSH alone or both hormones resulted in percentages of histologically normal follicles similar to those of noncultured control tissue. However, no statistical differences were observed between the culture conditions. This result could be explained by the fact that α -MEM, which is routinely used in caprine preantral follicle cultures, is the richest formulation of MEM, composed of 21 essential amino acids, vitamins, inorganic salts, and pyruvate. Furthermore, it is known that other substances and energetic substrates like hypoxanthine and glutamine, which were added to our culture medium, are important for maintaining caprine preantral follicle survival after *in vitro* culture in MEM (Silva et al., 2004). Under their experimental conditions, Adriaens et al. (2006) observed no significant differences between different melatonin concentrations (1 nM – 2 mM) on follicular survival; however, the addition of 100 μ M melatonin increased progesterone and androstenedione production. In addition, melatonin can act as an inhibitor of apoptosis in hepatic (Guha et al., 2007) and pineal (Yoo et al., 2002) cells and therefore might also contribute to follicular survival. Apoptosis can be caused by reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species production, and the addition of antioxidants such as melatonin to the culture medium could protect follicular cells against oxidative stress. The supplementation of *in vitro* oocyte maturation medium with melatonin reduces ROS levels in porcine and bovine oocytes (El-Raey et al., 2011; Kang et al. 2009). Furthermore, the addition of FSH to our culture medium could support the diffusion of several essential chemical and

physical factors through the basement membrane, thus helping to maintain follicular survival after seven days of culture (Chun et al., 1994; Hsueh et al., 1994).

After seven days of culture, there was high follicular activation (i.e. the transition from primordial to developing follicles) in all culture conditions compared to fresh controls. However, we did not observe a significant effect of melatonin on follicular activation when compared to tissues cultured in α -MEM+. As mentioned above, this result may be explained by the use of α -MEM+ as a basic medium, which is rich in nutrients (amino acids, carbohydrates and vitamins) and DNA precursors that promote cell division (Hartshorne, 1997). Similarly, some studies have shown that MEM+ alone, with the same supplementation used in our study, can promote oocyte and follicular growth in goats (Martins et al., 2005; Matos et al., 2007). Therefore, the *in vitro* conditions used in the current study facilitated follicular development from slices of cultured ovarian tissues, possibly through the release of stimulatory factors or by preventing the production of inhibitory factors by oocytes or stromal, granulosa or prethecal cells within the cortical ovarian tissue (Silva et al., 2006).

The present study demonstrated a positive effect of melatonin on follicular and oocyte growth. After seven days of culture, the combination of the highest concentration of melatonin (1000 pg/ml) and FSH (50 ng/ml) significantly increased follicular and oocyte diameters when compared to the cultures with α -MEM+ alone (cultured control). There is almost no information in the literature on the influence of melatonin on ovarian follicle development. The hypothesis that melatonin could regulate follicular development is supported by the presence of melatonin receptors (MT1 and MT2) in porcine and bovine ovarian cells (El-Raey et al., 2011; Kang et al., 2009) and the detection of high melatonin levels in porcine follicular fluid (Shi et al., 2009). Moreover, its action as an antioxidant (Rodríguez et al., 2004; Tomás-Zapico et

al., 2005) can improve preantral follicle growth through the protection of follicular cells against damage caused by ROS formed during *in vitro* culture. The modulation of growth factor expression by melatonin might also support follicular development. For example, melatonin (0.01–10 µg/mL) stimulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) production in cultured human granulosa cells (Schaeffer and Sirotkin, 1997). IGF-I is a mitogenic peptide that stimulates DNA synthesis and estradiol and progesterone secretion by human granulosa cells (Poretsky et al., 1999). As an indirect effect of melatonin, increasing IGF-I expression and the resulting granulosa cell proliferation could explain follicular growth observed in the present study. IGF-I has been shown to stimulate *in vitro* growth of human (Louhio et al., 2000), cattle (Gutierrez et al., 2000), rat (Zhao et al., 2001), and mouse follicles (Liu et al., 1998) synergistically with FSH. Furthermore, FSH stimulates cell proliferation, and the FSH receptor is similarly found in granulosa cells of follicles (Xu et al., 1995) from the primary stage onward. Although FSH receptors are not present in primordial follicles, FSH seems to play an indirect role in early follicular development through the release of paracrine factors produced by the larger follicles or by ovarian stroma cells (Van Den Hurk and Zhao, 2005).

In the present work, we used accurate methods for the evaluation of follicular viability including transmission electron microscopy (TEM) and fluorescence microscopy. We found that in the fresh control tissue and in tissues cultured for seven days in the presence of 1000 pg/ml of melatonin and FSH, important structures such as mitochondria, endoplasmic reticulum and granulosa cells, as well as basement, oocyte and nuclear membranes, were preserved. Normal follicles had an ultrastructure similar to that previously described for goats (Lucci et al., 2001) and for other species such as swine (Greenwald and Moor, 1989), bovine (Van Wezel and Rodgers, 1996) and human (Oktay et al., 1997). In addition to ultrastructural analysis, preantral follicles were

further analyzed with a viability assay. The fluorescent probes (calcein-AM and ethidium homodimer-1) have been successfully used to assess the viability of bovine (Schotanus et al., 1997), canine (Lopes et al., 2009) and caprine (Chaves et al. 2010) early staged follicles. In the present study, the results of this assay were similar to those observed using ultrastructural analysis, suggesting that TEM is a reliable method to assess viability of preantral follicles.

We conclude that 1000 pg/ml of melatonin combined with FSH plays an important role in early folliculogenesis in goats, promoting follicular growth after seven days of culture. In addition, these results demonstrated that the combined effects of these hormones maintain ultrastructural integrity and viability of caprine preantral follicles *in vitro* for up to seven days. These results provide a foundation for future studies aimed at growing caprine oocytes and follicles from the earliest (primordial) follicle stage up to the preovulatory stage, when oocytes can be matured and fertilized *in vitro*.

Declaration of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Author contributions

In this study, the co-authors R.M.P. Rocha, L.F. Lima, A.M.C.V. Alves, J.J.H. Celestino, M.H.T. Matos, I.B. Lima-Verde, C.A.P. Lopes, S.N. Bão, C.C. Campello, A.P.R. Rodrigues and J.R. Figueiredo contributed to the study design and drafted the paper. C. C. Campello contributed to the analysis of the data.

Acknowledgments

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, grant number: 554812/2006-1-RENORBIO), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and the Brazilian Innovation Agency (FINEP). Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha is a recipient of a grant from CAPES.

References

- 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, 333–343.
- 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. *J. Biol. Rhythm.* 16, 254-263.
- Brzezinski, A., Seibel, M.M., Lynch, H.J., Deng, M.H., Wurtman, R.J., 1987. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J. Clin. Endocr. Metab.* 64, 865–867.
- Carcangiu, V., Vacca, G.M., Mura, M.C., Dettori, M.L., Pazzola, M., Luridiana, S., Bin, P.P., 2009. Relationship between MTNR1A melatonin receptor gene polymorphism and seasonal reproduction in different goat breeds. *Anim. Reprod. Sci.* 110, 71–78.
- Chaves, R.N., Alves, A.M.C.V., Duarte, A.B., Araújo, V.R., Celestino, J.J., Matos, M.H.T., Lopes, C.A.P., Campello, C.C., Name, K.P., Bão, S.N., Figueiredo, J.R., 2010. Nerve growth factor promotes the survival of goat preantral follicles cultured in vitro. *Cell Tissues Organs* 192, 272-282.

Chaves, R.N., Martins, F.S., Saraiva, M.V.A., Celestino, J.J.H., Lopes, C.A.P., Correia, J.C., Lima-Verde, I.B., Matos, M.H.T., B  o, S.N, Name, K.P.O., Campello, C.C., Silva, J.R.V., Figueiredo, J.R., 2008. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. *Reprod. Fert. Develop.* 20, 640-647.

Chun, S.Y., Billig, H., Tilly, J.L., Furuta, I., Tsafriri, A., Hsueh, A.J., 1994. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 135, 1845–1853.

Cortvrindt, R., Smitz, J.E.J., 2001. In vitro follicle growth: Achievements in mammalian species. *Reprod. Domest. Anim.* 36, 3-9.

El-Raey, M., Geshi, M., Somfai, T., Kaneda, M., Hirako, M., Abdel-Ghaffar, A.E., Sosa, G.A., El-Roos, M.E., Nagai, T., 2011. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 250-262.

Fortune, J.E., 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 135-163.

Greenwald, G.S., Moor, R.M., 1989. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *J. Reprod. Fertil.* 87, 561– 571.

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. *J. Pineal Res.* 43, 372–381.

Gutierrez, C.G., Ralph, J.H., Telfer, E.E., Wilmut, I., Webb, R., 2000. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol. Reprod.* 62, 1322-1328.

Hartshorne, G.M., 1997. In vitro culture of ovarian follicles. *Rev. Reprod.* 2, 94–104.

Hsueh, A.J., Billig, H., Tsafiriri, A., 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.* 15, 707–724.

Itoh, M.T., Ishizuka, B., Kuribayashi, Y., Amemiya, A., Sumi, Y., 1999. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol. Hum. Reprod.* 5, 402–408.

Jan, J.E., Reiter R.J., Wasdell, M.B., Bax, M., 2009. The role of the thalamus in sleep, pineal melatonin production and circadian rhythm sleep disorder. *J. Pineal Res.* 46, 1–7.

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. *J. Pineal Res.* 46, 22–28.

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. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 126–132.

Liu, X., Andoh, K., Yokota, H., Kobayashi, J., Abe, Y., Yamada, K., Mizunuma, H., Ibuki, Y., 1998. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology* 139, 2342-2347.

Lopes, C.A.P., Dos Santos, R.R., Celestino, J.J.H., Melo, M.A., Chaves, R.N., Campello, C.C., Silva, J.R.V., Bão, S.N., Jewgenow, K., Figueiredo, J.R., 2009. Short-

term preservation of canine preantral follicles: effects of temperature, medium and time. *Anim. Reprod. Sci.* 115, 201–214.

Louhio, H., Hovatta, O., Sjoberg, J., Tuuri, T., 2000. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Mol. Hum. Reprod.* 6, 694- 698.

Lucci, C.M., Amorim, C.A., Bão, S.N., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R., Silva, J.R.V., 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. *Anim. Reprod. Sci.* 56, 39-49.

Lucci, C.M., Silva, J.R.V., Carvalho, C.A., Figueiredo, J.R., Bão, S.N., 2001. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Rumin. Res.* 41, 61–69.

Martins, F.S., Van Den Hurk, R., Santos, R.R., Silva, J.R.V., Matos, M.H.T., Celestino, J.J.H., Rodrigues, A.P.R., Pessoa, C., Ferreira, F.V.A., Figueiredo, J.R., 2005. Development of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. *Anim. Reprod.* 2, 106-113.

Matos, M.H.T., Lima-Verde, I.B., Luque, M.C.A., Maia Jr., J.E., Silva, J.R.V., Celestino, J.J.H., Martins, F.S., Bão, S.N., Lucci, C.M., Figueiredo, J.R., 2007. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote* 15, 173-182.

- Nakamura, Y., Tamura, H., Takayama, H., Kato, H., 2003. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertil. Steril.* 80, 1012-1016.
- Oktay, K., Briggs, D., Gosde, R.G., 1997. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J. Clin. Endocr. Metab.* 82, 3748–3751.
- 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. *Prog. Neurobiol.* 85, 335–353.
- Poretsky, L., Cataldo, N.A., Rosenwaks, Z., Giudice, L.C., 1999. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr. Rev.* 20, 535–582.
- Rodríguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* 36, 1–9.
- Rönnerberg, L., Kauppila, A., Leppäluoto, J., Martikainen, H., Vakkuri, O., 1990. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J. Clin. Endocr. Metab.* 71, 492–496.
- Schaeffer, H.J., Sirotkin, A.V., 1997. Melatonin and serotonin regulate the release of insulin-like growth factor-I, oxytocin and progesterone by cultured human granulosa cells. *Exp. Clin. Endocr. Diab.* 105, 109–112.
- Schotanus, K., Hage, W.J., Vanderstichele, H., Van Den Hurk, R., 1997. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology* 48, 471–483.

- 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. *J. Pineal Res.* 47, 318–323.
- Silva, J.R.V., Tharasanit, T., Taverne, M.A., Van Der Weijden, G.C., Santos, R.R., Figueiredo, J.R., Van Den Hurk, R., 2006. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. *J. Endocrinol.* 29, 113–125.
- Silva, J.R.V., Van Den Hurk, R., Costa, S.H.F., Andrade, E.R., Nunes, A.P.A., Ferreira, F.V.A., Lôbo, R.N.B., Figueiredo, J.R., 2004. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim. Reprod. Sci.* 81, 273–286.
- 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. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 694–702.
- Thomas, F.H., Ethier, J.F., Shimasaki, S., Vanderhyden, B.C., 2005. Follicle-Stimulating Hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology* 146, 941-949.
- Tomás-Zapico, C., Coto-Montes, A., 2005. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J. Pineal Res.* 39, 99–104.
- Van Den Hurk, R., Zhao, J., 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63, 1717-1751.
- Van Wezel, I., Rodgers, R.J., 1996. Morphological characterization of primordial follicles and their environment in vivo. *Biol. Reprod.* 55, 1003–1010.

Wehr, T., Aeschbach, D., Duncan, W., 2001. Evidence for a biological dawn and dusk in the human circadian timing system. *J. Physiol.* 535, 937–951.

Xu, Z., Garverick, A., Smith, G.W., Smith, M.F., Amilton, S.A., Younquist, R., 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod.* 53, 951–957.

Yoo, Y.M., Yim, S.V., Kim, S.S., Jang, H.Y., Lea, H.Z., Hwang, G.C., Kim, J.E., Kim, S.A., Lee, H.J., Kim, C.J., Chung, J.H., Leem, K.H., 2002. Melatonin suppresses NO-induced apoptosis via induction of Bcl-2 expression in PGT-beta immortalized pineal cells. *J. Pineal Res.* 33, 146–150.

Zhao, J., Tavene, M.A.M., Van der Weijden, G.C., Bevers, M.M., Van Den Hurk, R., 2001. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 287-296.

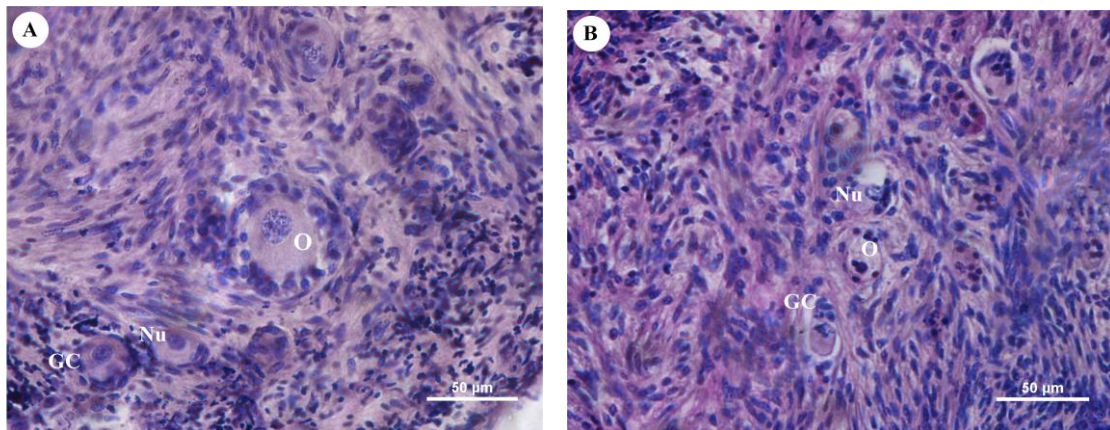


Figure 1. Histological sections (400 X) of ovarian fragments after periodic acid Schiff-hematoxylin staining showing morphologically normal (**A**) and degenerated (**B**) follicles after culture with 1000 pg/ml of melatonin plus 50 ng/ml of FSH for 7 days. O = Oocyte; Nu = oocyte nucleus; GC = granulosa cell.

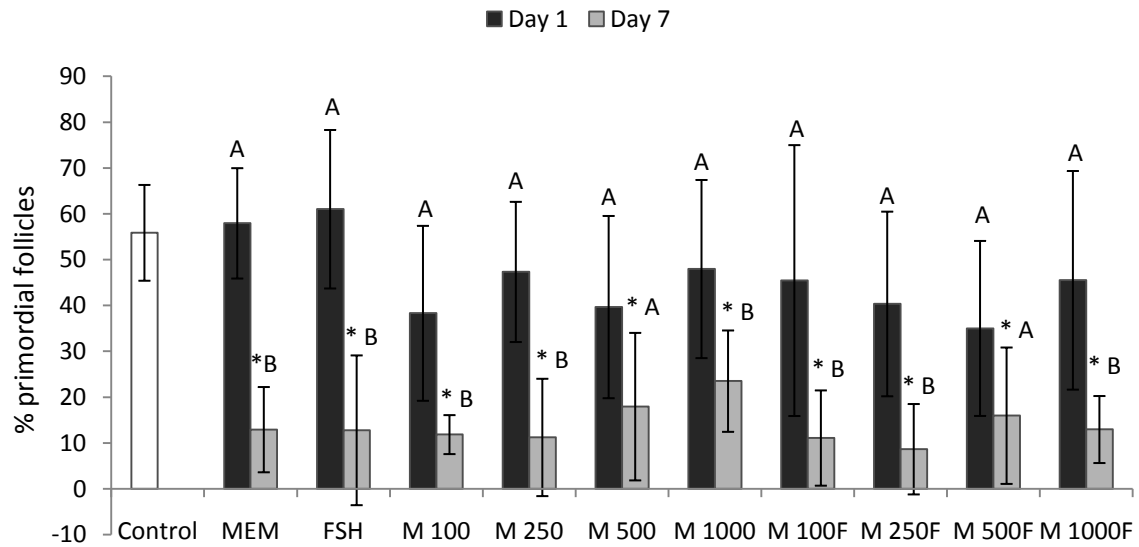


Figure 2. Percentages of primordial follicles in the fresh control (noncultured tissue) and 1 or 7 day cultured tissue in medium containing melatonin and/or FSH.

* differs significantly from control follicles ($P < 0.05$).

^{A, B} Different letters denote significant differences between culture periods within each treatment group ($P < 0.05$).

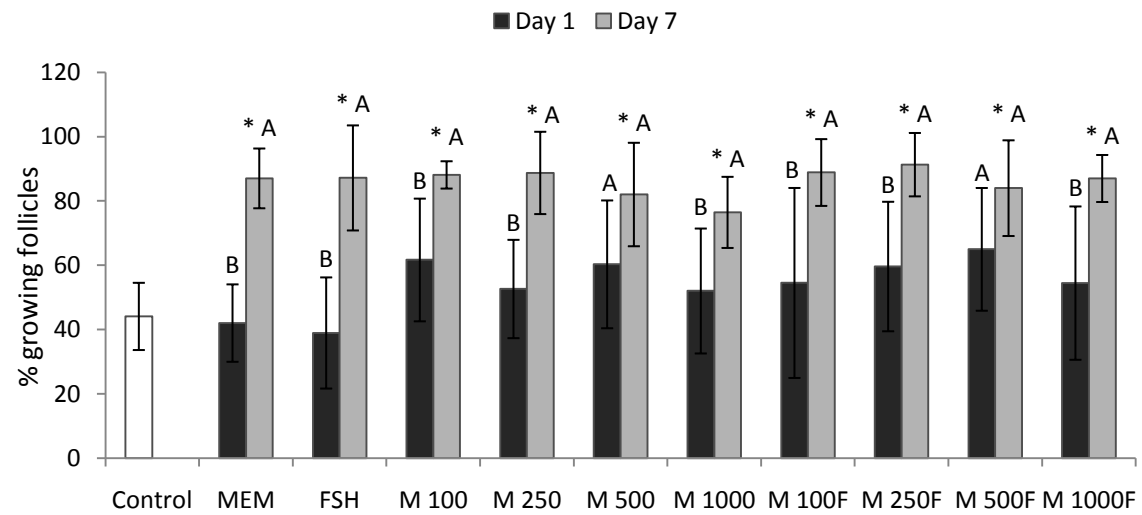


Figure 3. Percentages of developing follicles in the fresh control (noncultured tissue) and 1 or 7 day cultured tissue in medium containing melatonin and/or FSH.

* differs significantly from control follicles ($P < 0.05$).

^{A, B} Different letters denote significant differences between culture periods within each treatment group ($P < 0.05$).

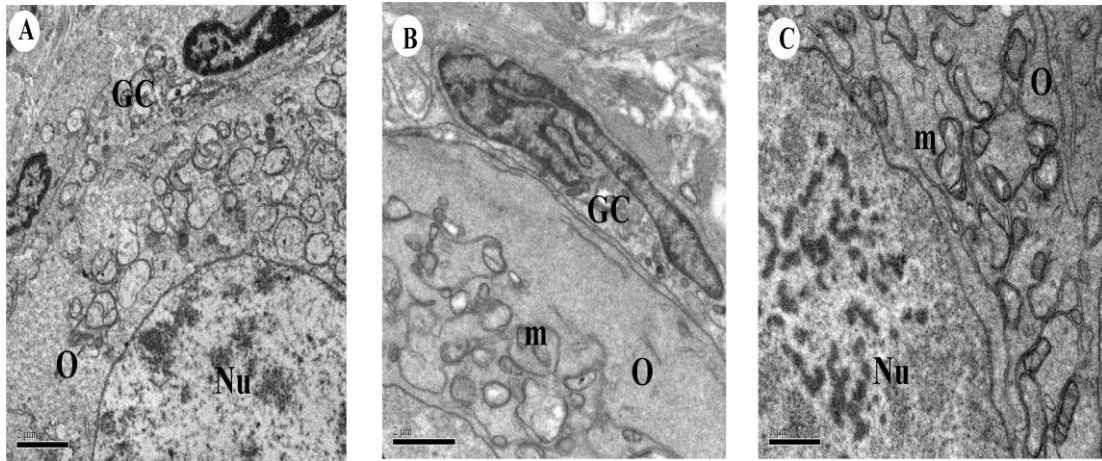


Figure 4. Electron micrographs of ultrastructurally normal preantral follicles before (**A**, Original magnification $\times 10,000$) and after (**B-C**) 7 days of culture in α -MEM+ supplemented with 1000 pg/ml of melatonin plus 50 ng/ml of FSH (**B**, original magnification $\times 12,000$; **C**, original magnification $\times 20,000$). Note in **A** and **B** the intact oocyte and nuclear membranes, nuclei with decondensed chromatin and granulosa cells with elongated nuclei and high nucleus-cytoplasm ratios. In **C**, note the vesicles and organelles, predominantly mitochondria, that are uniformly distributed in the cytoplasm. GC = granulosa cell, O = oocyte, Nu = oocyte nucleus, m = mitochondria.

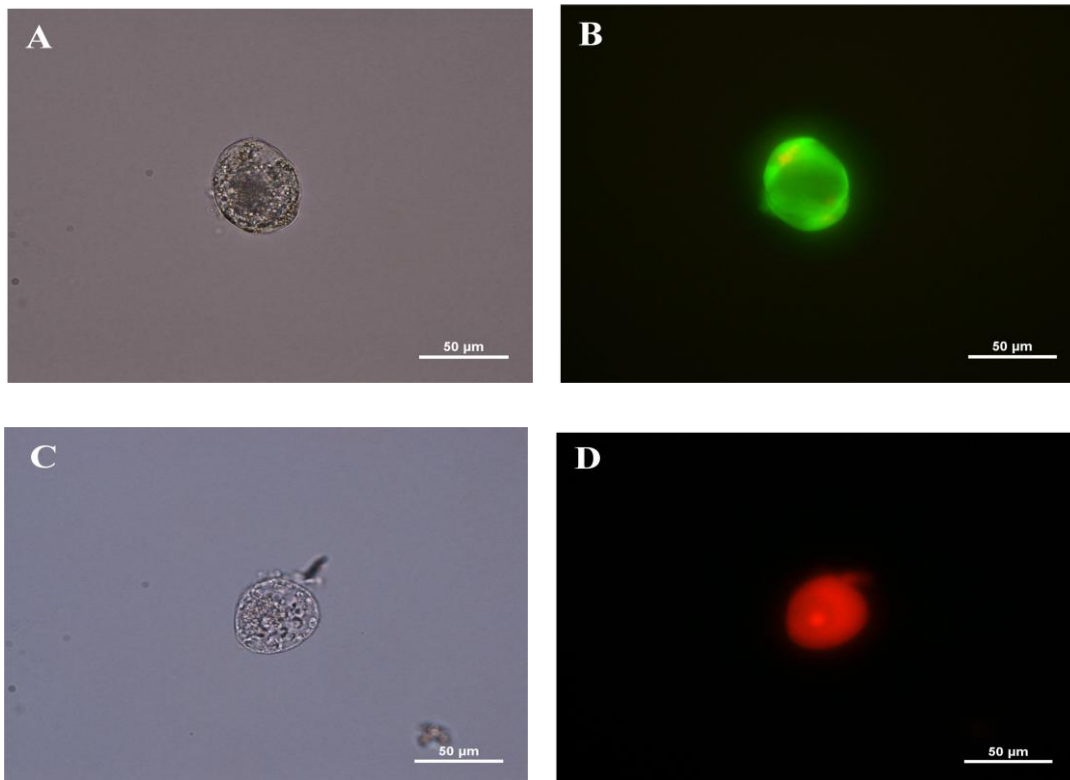


Figure 5. Assessment of the viability of caprine preantral follicles using fluorescent probes. **A, B** Treated preantral follicle cultured for 7 days in medium supplemented with 1000 pg/ml of melatonin and 50 ng/ml of FSH and classified as viable since cells were labeled with calcein AM (green fluorescence). **C, D** Preantral follicle cultured for 7 days in α -MEM alone and classified as nonviable since cells were positive for ethidium homodimer-1 (red fluorescence).

Table 1. Percentages of morphologically normal caprine preantral follicles in the fresh control (uncultured) and 1 or 7 day cultured tissue in medium containing melatonin and/or FSH.

Fresh Control: 79.31 ± 10.36		
Treatments	D1	D7
MEM	75.97 ± 9.81	61.99 ± 3.82
FSH	69.31 ± 11.89	62.65 ± 5.50
M 100	66.65 ± 10.26	58.65 ± 9.61 *
M 250	74.64 ± 14.66	56.63 ± 14.34 *
M 500	63.31 ± 22.24	62.65 ± 13.21
M 1000	77.30 ± 11.87	69.97 ± 4.07
M 100F	72.64 ± 9.23	57.33 ± 5.96 *
M 250F	53.31 ± 13.36	54.67 ± 5.01 *
M 500F	71.31 ± 14.65	59.98 ± 8.49 *
M 1000F	74.64 ± 15.00	62.64 ± 10.91

* differs significantly from control follicles (P < 0.05).

Table 2. Mean follicular diameter in the fresh control (noncultured tissue) and 1 or 7 day cultured tissue in medium containing melatonin and/or FSH.

Fresh Control: 34.91 ± 3.94		
Treatments	D1	D7
MEM	33.82 ± 4.43 ^A	34.11 ± 4.79 ^A
FSH	34.11 ± 3.64 ^A	34.54 ± 4.66 ^{A, a, b}
M 100	32.87 ± 4.47 ^A	34.62 ± 4.63 ^{A, a, b}
M 250	34.03 ± 5.08 ^A	33.23 ± 3.97 ^{A, b}
M 500	33.89 ± 5.20 ^A	34.69 ± 3.95 ^{A, a, b}
M 1000	34.11 ± 4.55 ^A	34.69 ± 5.71 ^{A, a, b}
M 100F	33.45 ± 4.90 ^A	32.43 ± 2.79 ^{A, b}
M 250F	31.70 ± 4.77 ^A	33.38 ± 4.33 ^{A, b}
M 500F	33.09 ± 4.36 ^A	32.36 ± 4.45 ^{A, b}
M 1000F	31.70 ± 3.10 ^B	38.26 ± 4.70 ^{† A, a}

[†] differs significantly from α -MEM+ (P < 0.05).

^{a, b} Different lowercase letters denote significant differences between treatment groups for the same culture period (P < 0,05).

^{A, B} Different capital letters denote significant differences between culture periods within each treatment group (P < 0,05).

Table 3. Mean oocyte diameter in the fresh control (noncultured tissue) and 1 or 7 day cultured tissue in medium containing melatonin and/or FSH.

Fresh Control: 26.60 ± 2.95		
Treatments	D1	D7
MEM	24.92 ± 3.17 ^A	25.14 ± 3.92 ^A
FSH	25.36 ± 3.46 ^A	26.75 ± 3.99 ^{A, a, b}
M 100	25.07 ± 3.83 ^A	25.80 ± 3.48 ^{A, a, b}
M 250	25.29 ± 4.42 ^A	24.49 ± 3.30 ^{A, b}
M 500	25.58 ± 3.97 ^A	27.18 ± 4.13 ^{A, a, b}
M 1000	25.22 ± 4.21 ^A	27.26 ± 4.36 ^{A, a, b}
M 100F	25.14 ± 3.06 ^A	26.38 ± 2.50 ^{A, a, b}
M 250F	23.47 ± 3.13 ^{*, A}	25.07 ± 3.26 ^{A, a, b}
M 500F	25.36 ± 3.12 ^A	24.49 ± 3.74 ^{A, b}
M 1000F	23.76 ± 2.42 ^B	28.35 ± 3.83 ^{† A, a}

* differs significantly from control follicles (P < 0.05).

† differs significantly from α -MEM+ (P < 0.05).

^{a, b} Different lowercase letters denote significant differences between treatment groups for the same culture period (P < 0,05).

^{A, B} Different capital letters denote significant differences between culture periods within each treatment group (P < 0,05).

8 CONCLUSÕES

A adição de 1000 pg/ml de melatonina associada ao FSH promoveu o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos após sete dias de cultivo. Além disso, a interação entre esses dois hormônios manteve a integridade ultraestrutural e a viabilidade dos folículos cultivados por até sete dias.

9 PERSPECTIVAS

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma excelente ferramenta para estudar os fatores que controlam a foliculogênese e a atresia. Os bons resultados obtidos neste trabalho utilizando a melatonina associada ao FSH podem ser de grande valia para a elaboração dos meios de cultivo de base visando à obtenção de oócitos maduros a partir de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*. Entretanto, para um melhor entendimento da atuação da melatonina no desenvolvimento folicular em caprinos, são necessários estudos adicionais como a expressão dos seus receptores em células ovarianas e a sua influência em cultivo *in vitro*, na forma isolada, de folículos pré-antrais em estádios mais avançados de desenvolvimento.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; ZUNIGA, O. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos *in vitro*. *Veterinary Research Communications*, v. 26, p. 151–158, 2002.
- ABIR, R.; NITKE, S.; BEN-HAROUSH, A.; FISCH, B. *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress and methods for growth evaluation. *Histology and Histopathology*, v. 21, p. 887–898, 2006.
- ADRIAENS, I.; JACQUET, P.; CORTVRINDT, R.; JANSSEN, K.; SMITZ, J. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology*, v. 228, p. 333–343, 2006.
- ALEANDRI, V.; SPINA, V.; MORINI, A. The pineal gland and reproduction. *Human Reproduction*, v. 2, p. 225–235, 1996.
- ALILA-JOHANSSON, A.; ERIKSSON, L.; SOVERI, T.; LAAKSO, M. L. Seasonal variation in endogenous serum melatonin profiles in goats: A difference between spring and fall. *Journal of Biological Rhythms*, v. 16, p. 254-263, 2001.
- ALLEGRA, M.; REITER, R. J.; TAN, D. X.; GENTILE, C.; TESORIERE, L.; LIVREA, M. A. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *Journal of Pineal Research*, v. 34, p. 1–10. 2003.
- AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R.; GONÇALVES, P. B. D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 37, p. 269-277, 2000.
- ANDRADE, E. R.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A.; OLIVEIRA, J. A.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; FIGUEIREDO, J. R.; TONIOLLI, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 64, p.1104-1113, 2005.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v. 74, p. 884-94, 2010.

BAKER, J. R.; RANSON, R. M. Factors affecting the breeding of the field mouse (*Microtus agrestis*): I. Light. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 110, p. 313-322, 1932.

BARATTA, M.; TAMANINI, C. Effect of melatonin on the *in vitro* secretion of progesterone and estradiol 17 β by ovine granulosa cells. *Acta Endocrinologica*, v. 127, p. 366–370, 1992.

BAYDAS, G.; GURSU, M. F.; YILMAZ, S.; CANPOLAT, S.; YASAR, A.; CIKIM, G.; CANATAN, H. Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neuroscience Letters*, v. 323, p. 195–198, 2002.

BERLINGUER, F.; LEONI, G. G.; SUCCU, S.; SPEZZIGU, A.; MADEDDU, M.; SATTA, V.; BEBBERE, D.; CONTRERAS- SOLIS, I.; GONZALEZ-BULNES, A.; NAITANA, S. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. *Journal of Pineal Research*, v. 46, p. 383–391, 2009.

BITTMAN, E. L.; KAYNARD, A. H.; OLSTER, D. H.; ROBINSON, J. E.; YELLON, S. M.; KARSCH, F. J. Pineal melatonin mediates photoperiod control of pulsatile luteinizing hormone in the ewe. *Neuroendocrinology*, v. 40, p. 409–418, 1985.

BRÄNNSTRÖM, M.; MAYRHOFER, G.; ROBERTSON, S. A. Localization of leukocyte subsets in the rat ovary during the periovulatory period. *Biology of Reproduction*, v. 48, p. 277–286, 1993.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicular growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 109, p. 165-171, 1997.

BRZEZINSKI, A.; SCHENKER, J. G.; FIBICH, T.; LAUFER, N.; COHEN, M. Effects of melatonin on progesterone production by human granulosa lutein cells in culture. *Fertility and Sterility*, v. 58, p. 526–529, 1992.

BUCHANAN, T. W.; BRECHTEL, A.; SOLLERS, J. J.; LOVALLO, W. R. Exogenous cortisol exerts effects on the startle reflex independent of emotional modulation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 68, p. 203–210, 2001.

BUTCHER, L.; ULLMANN, S. L. Culture of Preantral Ovarian Follicles in the Grey, Short-tailed Opossum, *Monodelphis domestica*. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 8, p. 535-9, 1996.

CARCANGIU, V.; VACCA, G. M.; MURA, M. C.; DETTORI, M. L.; PAZZOLA, M.; LURIDIANA, S.; BIN, P. P. Relationship between MTNR1A melatonin receptor gene polymorphism and seasonal reproduction in different goat breeds. *Animal Reproduction Sciences*, v. 110, p. 71–78, 2009.

CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J. Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 93, p. 71–79, 1991.

CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J.; TELFER, E.; GOSDEN, R. G. Extraovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 90, p. 21-327, 1990.

CAVALLO, A. The pineal gland in human beings: relevance to pediatrics. *Journal of Pediatrics*, v. 123, p. 843-851, 1993.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 594-601, 1999.

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. *Reproduction Science*, v. 16, p. 239-246, 2009.

CHAVES, R. N.; ALVES, A. M. C. V.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; CELESTINO, J. J. H.; MATOS, M. H. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; NAME, K. P. O.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Nerve growth factor promotes the

survival of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Cell Tissues Organs*, v. 192, p. 272-282, 2010.

CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; LOPES, C. A. P.; CORREIA, J. C.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; BÁO, S. N.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reproduction Fertility and Development*, v. 20, p. 640-647, 2008.

CHUN, S. Y.; BILLIG, H.; TILLY, J. L.; FURUTA, I.; TSAFRIRI, A.; HSUEH, A. J. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, v. 135, p. 1845-1853, 1994.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. E. J. *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. *Reproduction Domestic Animal*, v. 36, p. 3-9, 2001.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. E. J.; VAN STEIRTEGHEM, A. C. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in a simplified culture system. *Human Reproduction*, v. 11, p. 2656–2666, 1996.

DEMEESTERE, I.; CENTNER, J.; GERVY, C.; ENGLERT, Y.; DELBAERE, A. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*, v.130, p.147–156, 2005.

DOWNEY, K. M.; TAN, C. K.; SO, A. G. DNA polymerase delta: a second eucaryotic DNA replicase. *Bioessays*, v. 12, p. 231-236, 1990.

DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. *Endocrine*, v. 27, p. 101–110, 2005.

DUBOCOVICH, M. L.; MASANA, M. I.; IACOB, S.; SAURI, D. M. 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*, v. 355, p. 365-375, 1997.

EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; ABDEL-GHAFFAR, A. E.; SOSA, G. A.; EL-ROOS, M. E.; NAGAI, T. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. *Molecular Reproduction & Development*, v. 78, p. 250-262, 2011.

EPPIG, J. J.; SCHROEDER, A. C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 41, p. 268–276, 1989.

ERICKSON, G. F. An analysis of follicles development and ovum maturation. In: *Seminars in Reproductive Endocrinology*, san Diego-California, v. 4, p. 233-254, 1986.

ESPEY, L. L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproduction*, v. 50, p. 233–238, 1994.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of development competence. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 203-216, 2003.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 143-152, 2007.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2 ed. São Paulo: Roca, p. 303-328, 2008.

FISKE, V. M.; PARKER, K. L.; ULMER, R. A.; OW, C. H.; AZIZ, N. 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*, v. 114, p. 407–410, 1984.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.135-163, 2003.

FRUNGIERI, M. B.; MAYERHOFER, A.; ZITTA, K.; PIGNATARO, O. P.; CALANDRA, R. S.; GONZALEZ-CALVAR, S. I. 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*, v. 146, p. 1541–1552, 2005.

GIMENO, M. F.; LANDA, A.; STERIN-SPEZIALE, N.; CARDINALI, D. P.; GIMENO, A. L. Melatonin blocks *in vitro* generation of prostaglandin by the uterus and hypothalamus. *European Journal of Pharmacology*, v. 62, p. 309–317, 1980.

GOLDMAN, B. D. Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms*, v. 16, p. 283–301, 2001.

GREENWALD, G. S.; MOOR, R. M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 87, p. 561–571, 1989.

GUHA, M.; MAITY, P.; CHOUBEY, V.; MITRA, K.; REITER, R. J.; BANDYOPADHYAY, U. Melatonin inhibits free radical-mediated mitochondrial-dependent hepatocyte apoptosis and liver damage induced during malarial infection. *Journal of Pineal Research*, v. 43, p. 372–381, 2007.

GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J. P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote*, v. 16, p. 57–63, 2008.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 1322–1328, 2000.

HARDELAND, R.; REITER, R. J.; POEGGELER, B.; TAN, D. X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 17, p. 347–357, 1993.

HARTSHORNE, G. *In vitro* culture of ovarian follicles. *Reviews of Reproduction*, v. 2, p. 94–104, 1997.

HASEGAWA, A.; MOCHIDA, N.; OGASAWARA, T.; KOYAMA, K. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by *in vitro* growth, *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, v. 863, p. 1182-1192, 2006.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, v.124, v.43-101, 1991.

HOVATTA, O.; SILYE, R.; ABIR, R.; KRAUSZ, T.; WINSTON, R. M. L. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Human Reproduction*, v. 12, p. 1032-1036, 1997.

HUETHER, G. The contribution of extrapineal site of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia*, v. 49, 665–670, 1993.

HSUEH, A. J.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrinology Review*, v. 15, p. 707–24, 1994.

IANAS, O.; OLNESCU, R.; BADESCU, I. Melatonin involvement in oxidative stress. *Romanian Journal of Endocrinology*, v. 29, p. 147–153, 1991.

ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; MURAI, K.; AMEMIYA, A.; ITOH, M. The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. *Journal of Pineal Research*, v. 28, p. 48–51, 2000.

ITOH, M. T.; ISHIZUKA, B.; KURIBAYASHI, Y.; AMEMIYA, A.; SUMI, Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Molecular Human Reproduction*, v. 5, p. 402–408, 1999.

JAHNKE, G.; MARR, M.; MYERS, C.; WILSON, R.; TRAVLOS, G.; PRICE, C. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, v. 50, p. 271–279, 1999.

JAN, J. E.; REITER R. J.; WASDELL, M. B.; BAX, M. The role of the thalamus in sleep, pineal melatonin production and circadian rhythm sleep disorder. *Journal of Pineal Research*, v. 46, p. 1–7, 2009.

JEWGENOW, K. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small preantral domestic cat follicles during short-term culture. *Theriogenology*, v. 49, p. 1567-1577, 1998.

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. *Theriogenology*, v. 39, p. 527-535, 1993.

JEWGENOW, K. N.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats - viability and ultrastructural investigations. *Animal Reproduction Science*, v. 44, p. 183-193, 1996.

JOHN, G. B.; GALLARDO, T. D.; SHIRLEY, L. J.; CASTRILLON, D. H. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Development Biology*, v. 321, p. 197-204, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. Oitava edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 332p, 2005.

KANG, J. T.; KOO, O. J.; KWON, D. K.; PARK, H. J.; JANG, G.; KANG, S. K.; LEE, B. C. 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*, v. 46, p. 22-28, 2009.

KIM, J. K.; LEE, C. J. Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in gamma-irradiated mouse. *Mutation Research*, v. 449, p. 33-39, 2000.

LEE, C.; DO, B. R.; LEE, Y.; PARK, J.; KIM, S.; KIM, J.; ROH, S.; YOON, Y.; YOON, H. Ovarian expression of melatonin Mel1a receptor mRNA during mouse development. *Molecular Reproduction and Development*, v. 59, p. 126-132, 2001.

LERCHL, A.; NIESCHLAG, E. Interruption of nocturnal pineal melatonin synthesis in spontaneous recrudescence Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Journal of Pineal Research*, v. 13, p. 36-41, 1992.

LIU, F.; NG, T. B. 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*, v. 78, p. 447–453, 2000.

LIU, J.; VAN DER ELST, J.; VAN DEN BROECKE, R.; DHONT, M. Live offspring by *in vitro* fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction*, v.64, p.171-178, 2001.

LIU, X.; ANDOH, K.; YOKOTA, H.; KOBAYASHI, J.; ABE, Y.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology*, v. 139, p. 2342-2347, 1998.

LOPES, C. A. P.; SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; MELO, M. A.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N.; JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J. R. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. *Animal Reproduction Science*, v. 115, p. 201-214, 2009.

LOUHIO, H.; HOVATTA, O.; SJOBERG, J.; TUURI, T. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Molecular Human Reproduction*, v. 6, p. 694- 698, 2000.

LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R.; GONÇALVES, P. B. D. Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 56, p. 39-49, 1999.

LUCCI, C. M.; SILVA, J. R. V.; CARVALHO, F. C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Ruminants Research*, v. 41, p. 61-69, 2001.

MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 25, p. 177–195, 2004.

MAGALHÃES, D. M.; ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.

Impact of pituitary FSH purification on *in vitro* early folliculogenesis in goats. *Biocell*, v. 33, p. 91-97, 2009.

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, v. 75, p. 182-188, 2011a.

MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; MORORÓ, M. B. S.; SILVA, C. M. G.; RODRIGUES, G. Q.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and *in vitro* maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, p. 134-140, 2011b.

MAGANHIN, C. C.; CARBONEL, A. A. F.; HATTY, J. H.; FUCHS, L. F. P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, I. S.; SIMÕES, M. J. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 54, p. 267-271, 2008.

MALPAUX, B.; MIGAUD, M.; TRICOIRE, H.; CHEMINEAU, P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *Journal of Biological Rhythms*, v. 16, p. 336-347, 2001.

MANJUNATHA, B. M.; DEVARAJ, M.; GUPTA, P. S. P.; RAVINDRA, J. P.; NANDI, S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo *in vitro* embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, p. 12-16, 2009.

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M. F.; MCCAULEY, T. C.; CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effects of culture medium, serum type and various concentrations of follicle stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 1197-1203, 2002.

MARTINEZ-MADRID, B.; CAMBONI, A.; DOLMANS, M. M.; NOTTOLA, S.; LANGENDONCKT, A. V.; DONNEZ, J. Apoptosis and ultrastructural assessment after

cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. *Fertility and Sterility*, v. 87, p. 1153-1165, 2007.

MARTINS, F. S.; VAN DEN HURK, R.; SANTOS, R. R.; SILVA, J. R. V.; MATOS, M. H. T.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; PESSOA, C.; FERREIRA, F. V. A.; FIGUEIREDO, J. R. Development of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. *Animal Reproduction*, v. 2, p. 106-113, 2005.

MASANA, M. I.; DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Science-Signal Transduction Knowledge Environment*, v. 107, pe39, 2001.

MASANA, M. I.; SOARES, J. M. JR.; DUBOCOVICH, M. L. 17β -Estradiol modulates hmt1 melatonin receptor function. *Neuroendocrinology*, v. 81, p. 87–95, 2005.

MATOS, M. H. T.; VAN DEN HURK, R.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C. A.; SANTOS, K. D. B.; MARTINS, F. S.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Effects of fibroblast growth factor-2 on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Cells Tissues Organs*, v. 186, 112-120, 2007a.

MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C. A.; MAIA Jr., J. E.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; MARTINS, F. S.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*, v. 15, p. 173-182, 2007b.

MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 433-442, 2007c.

MCGEE, E.; SPEARS, N.; MINAMI, S.; HSU, S. Y.; CHUN, S. Y.; BILLIG, H.; HSUEH, A. J. W. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3-5-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, v. 138, p. 2417–24, 1997.

MCLAUGHLIN, E. A.; MCIVER, S. C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction*, v. 137, p. 1-11, 2009.

MOLPECERES, V.; MAURIZ, J. L.; GARCÍA-MEDIAVILLA, M. V.; GONZÁLEZ, P.; BARRIO, J. P.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. 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*, v. 62, p. 687–695, 2007.

MOR, M.; PLAZZI, P. V.; SPADONI, G.; TARZIA, G. Melatonin. *Current Medicinal Chemistry*, v. 6, p. 501–518, 1999.

MORA, A.; KOMANDER, D.; VAN AALTEN, D. M.; ALESSI, D. R. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 15, p. 161–170, 2004.

MURUVI, W.; PICTON, H. M.; RODWAY, R. G.; JOYCE, I. M. *In vitro* growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen–thawed Lamb ovaries. *Theriogenology*, v.64, p.1357–1370, 2005.

NAKAMURA, Y.; TAMURA, H.; TAKAYAMA, H.; KATO, H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertility and Sterility*, v. 80, p. 1012-1016, 2003.

NILES, L. P.; WANG, J.; SHEN, L.; LOBB, D. K.; YOUNGLAI, E. V. Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 156, p. 107–110, 1999.

NODA, Y.; MORI, A.; LIBURDY, R.; PACKER, L. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. *Journal of Pineal Research*, v. 27, p. 159-163, 1999.

O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 1682–1686, 2003.

OKTAY, K.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. G. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.82, p.3748–3751, 1997.

OZTURK, G.; COSKUN, S.; ERBAS, D.; HASANOGLU, E. The effect of melatonin on liver superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels. *The Japanese Journal of Physiology*, v. 50, p. 149–153, 2000.

PANDI-PERUMAL, S. R.; SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G. J. M.; CARDINALI, D. P.; POEGGELER, B.; HARDELAND, R. Melatonin: nature's most versatile biological signal? *FEBS Journal*, v. 273, p. 2813–2838, 2006.

PANDI-PERUMAL, S. R.; TRAKHT, I.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D. W.; MAESTRONI, G. J.; ZISAPEL, N.; CARDINALI, D. P. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology*, v. 85, p. 335–353, 2008.

PAPIS, K.; POLESZCZUK, O.; WENTA-MUCHALSKA, E.; MODLINSKI, J. A. Melatonin effect on bovine embryo development *in vitro* in relation to oxygen concentration. *Journal of Pineal Research*, v. 43, p. 321–326, 2007.

PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, v. 140, p. 4262–4271, 1999.

PICINATO, M. C.; HIRATA, A. E.; CIPOLLA-NETO, J.; CURI, R.; CARVALHO, C. R.; ANHÊ, G. F.; CARPINELLI, A. R. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. *Journal of Pineal Research*, v. 44, p. 88–94, 2008.

PICTON, H. M.; HARRIS, S. E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E. L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v.136, p.703–715, 2008.

PIERI, C.; MARRA, M.; MONARI, R.; RECCHIONI, R.; MARCHESELLI, F. Melatonin: A peroxy radical scavenger more potent than vitamin E. *Life Sciences*, v. 55, p. 271–276, 1994.

PORETSKY, L.; CATALDO, N. A.; ROSENWAKS, Z.; GIUDICE, L. C. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocrine Reviews*, v. 20, p. 535–82, 1999.

RATTS, V. S.; FLAWS, J. A.; KOLP, R.; SORENSON, C. M.; TILLY, J. L. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology*, v. 136, p. 3665–3668, 1995.

REDDY, P.; LIU, L.; ADHIKARI, D.; JAGARLAMUDI, K.; RAJAREDDY, S.; SHEN, Y.; DU, C.; TANG, W.; HÄMÄLÄINEN, T.; PENG, S. L.; LAN, Z.-J.; COONEY, A. J.; HUHTANIEMI, I.; LIU, K. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, v. 319, p. 611-613, 2008.

REDDY, P.; ZHENG, W.; LIU, K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 21, p. 96-103, 2010.

REITER, R. J.; TAN, D. X. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovascular Research*, v. 58, p. 10–19, 2003.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; PAREDES, S. D.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M. Melatonin and reproduction revised. *Biology of Reproduction*, v. 81, p. 445-456, 2009.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classifications of subtypes. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 107, p. 100-102, 1996.

RICHARDS, J. S.; RUSSELL, D. L.; OCHSNER, S.; ESPEY, L. L. Ovulation: new dimensions and new regulators sponse. *Annual Review of Physiology*, v. 64, p. 69–92, 2002.

RIVERA-BERMUDEZ, M. A.; MASANA, M. I.; BROWN, G. M.; EARNEST, D. J.; DUBOCOVICH, M. L. Immortalized cells from the rat suprachiasmatic nucleus express functional melatonin receptors. *Brain Research*, v. 1002, p. 21-27, 2004.

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN V. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, v. 36, p. 1–9, 2004.

RÖNNBERG, L.; KAUPPILA, A.; LEPPÄLUOTO, J.; MARTIKAINEN, H.; VAKKURI, O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 71, p. 492–496, 1990.

ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; FAUSTINO, L. R.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; NAME, K. P. O.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 37, p. 112–123, 2009.

ROY, D.; ANGELINI, N. L.; FUJIEDA, H.; BROWN, G. M.; BELSHAM, D. D. Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. *Endocrinology*, v. 142, p. 4711–4720, 2001.

ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertility and Sterility*, v. 59, p. 783–790, 1993.

SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E. A.; VELOJERDI, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, v. 78, p. 644–645, 2002.

SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; ALMEIDA, A. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. *Reproductive Science*, v. 17, p. 1135–1143, 2010.

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. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, v. 105, p. 109–112, 1997.

SCHOTANUS, K.; HAGE, W. J.; VANDERSTICHELE, H.; VAN DEN HURK, R. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 48, p. 471–483, 1997.

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. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves *in vitro* maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. *Journal of Pineal Research*, v. 47, p. 318–323, 2009.

SILMAN, R. E. Melatonin: a contraceptive for the nineties. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 49, p. 3–9, 1993.

SILVA, C. M. G.; MATOS, M. H. T.; RODRIGUES, G. Q.; FAUSTINO, L. R.; PINTO, L. C.; CHAVES, R. N.; ARAÚJO, V. R.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. *Animal Reproduction Science*, v. 117, p. 83-89, 2010.

SILVA, J. R. V.; THARASANIT, T.; TAVERNE, M. A. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. *Journal of Endocrinology*, v. 189, p. 113-125, 2006.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R.; NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science*, v. 81, p. 273-286, 2004.

SIROTKIN, A. V. Direct influence of melatonin on steroid, nonapeptide hormones, and cyclic nucleotide secretion by granulosa cells isolated from porcine ovaries. *Journal of Pineal Research*, v. 17, p. 112–117, 1994.

SISK, C. L.; FOSTER, D. L. The neural basis of puberty and adolescence. *Nature Neuroscience*, v. 7, p. 1040–1047, 2004.

SLAUGENHAUPT, S. A.; ROCA, A. L.; LIEBERT, C. B.; ALTHERR, M. R.; GUSELLA, J. F.; REPPERT, S. M. Mapping of the gene for the Mel1a-melatonin

receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a). *Genomics*, v. 27, p. 355–357, 1995.

SOARES, J. M. JR.; MASANA, M. I.; ERSAHIN, C.; DUBOCOVICH, M. L. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 306, p. 694–702, 2003.

SPEARS, N.; MURRAY, A. A.; ALLISON, V.; BOLAND, N. I.; GOSDEN, R. G. Role of gonadotrophins and ovarian steroids in the development of mouse follicles *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 113, p. 19–26, 1998.

SRINIVASAN, V.; SPENCE, W. D.; PANDI-PERUMAL, S. R.; ZAKHARIA, R.; BHATNAGAR, K. P.; BRZEZINSKI, A. Melatonin and human reproduction: Shedding light on the darkness hormone. *Gynecological Endocrinology*, v. 25, p. 779–785, 2009.

STALDEMANN, C.; LASSMANN, H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell and Tissue Research*, v. 301, p. 19–31, 2000.

STORMSHAK, F. Biochemical and endocrine aspects of oxytocin production by the mammalian corpus luteum. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 1, p. 92–97, 2003.

SUGINO, N. Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reproductive Medicine and Biology*, v. 4, p. 31–44, 2005.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X.; SUGINO, N.; REITER, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertility and Sterility*, v. 92, p. 328 – 343, 2009.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; TAKIGUCHI, S.; KASHIDA, S.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N.; KATO, H. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. *Journal of Pineal Research*, v. 25, p. 135–141, 1998.

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. Oxidative stress

impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, v. 44, p. 280–287, 2008.

TAN, D. X.; CHEN, L. D.; POEGGELER, B.; MANCHESTER, L. C. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine*, v. 1, p. 57-60, 1993.

TANAVDE, V. S.; MAITRA, A. *In vitro* modulation of steroidogenesis and gene expression by melatonin: a study with porcine antral follicles. *Endocrine Research*, v. 29, p. 399–410, 2003.

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M.; DING, C.; THONG, K. J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reproduction*, v. 23, p. 1151-1158, 2008.

THOMAS, F. H.; ETHIER, J. F.; SHIMASAKI, S.; VANDERHYDEN, B. C. Follicle-Stimulating Hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology*, v. 146, p. 941-949, 2005.

TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *Journal of Pineal Research*, v. 39, p. 99–104, 2005.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; BECKER, J. F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology*, v. 47, p. 73-82, 1997.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiological Reviews*, v. 78, p. 687-721, 1998.

VAN WEZEL, I.; RODGERS, R. J. Morphological characterization of primordial follicles and their environment *in vivo*. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 1003–1010, 1996.

VIJAYALAXMI; REITER, R. J.; TAN, D. X.; HERMAN, T. S.; THOMAS, C. R. JR. Melatonin as a radioprotective agent: a review. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v. 59, p. 639–653, 2004.

VIJAYALAXMI; THOMAS, C. R. JR.; REITER, R. J.; HERMAN, T. S. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *Journal of Clinical Oncology*, v. 20, p. 2575-2601, 2002.

VINCENT, L.; COHEN, W.; DELAGRANGE, P.; BOUTIN, J. A.; NOSJEAN, O. Molecular and cellular pharmacological properties of 5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine (MCA-NAT): a nonspecific MT3 ligand. *Journal of Pineal Research*, v. 48, p. 222–229, 2010.

WANDJI, S. A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 45, p. 817-832, 1996.

WANDJI, S. A.; SRSEN, V.; NATHANIELSZ, P. W.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. *Human Reproduction*, v. 12, p. 1993–2001, 1997.

WEBLEY, G. E.; LEIDENBERGER, F. The circadian pattern of melatonin and its positive relationship with progesterone in women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 63, p. 323–328, 1986.

WEBLEY, G. E.; LUCK, M. R. Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 78, p. 711–717, 1986.

WEHR, T.; AESCHBACH, D.; DUNCAN, W. Evidence for a biological dawn and dusk in the human circadian timing system. *Journal of Physiology*, v. 535, p. 937–951, 2001.

WEST, E. R.; XU, M.; WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on *in vitro* follicle development. *Biomaterials*, v. 28, p. 4439–4448, 2007.

WILTBANK, M. C.; OTTOBRE, J. Regulation of intraluteal production of prostaglandins. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 1, p. 91–101, 2003.

WOO, M. M. M.; TAI, C. J.; KANG, S. K.; NATHWANI, P. M.; PANG, S. F.; LEUNG, P. C. K. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 86, p. 4789–4797, 2001.

WRIGHT, C. S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R. M. L.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the *in vitro* growth of human ovarian follicles. *Human Reproduction*, v. 14, p. 1555–1562, 1999.

WU, J.; EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 375–381, 2001.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology Reproduction*, v. 53, p. 951–957, 1995.

YIE, S. M.; NILES, L. P.; YOUNGLAI, E. V. Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 80, p. 1747–1749, 1995.

YOO, Y. M.; YIM, S. V.; KIM, S. S.; JANG, H. Y.; LEA, H. Z.; HWANG, G. C.; KIM, J. E.; KIM, S. A.; LEE, H. J.; KIM, C. J.; CHUNG, J. H.; LEEM, K. H. Melatonin suppresses NO-induced apoptosis via induction of Bcl-2 expression in PGT-beta immortalized pineal cells. *Journal of Pineal Research*, v. 33, p. 146–150, 2002.

YUAN, J. H.; WANG, J. Z.; LAN, G. C.; SUI, H. S.; YU, J. N.; TAN, J. H. Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of steroid hormones during development of ovarian follicles in prepubertal goats. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 34, p. 451–460, 2008.

ZHAO, J.; TAVENE, M. A. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of

cultured rat pre-antral follicles. *Molecular Reproduction & Development*, v. 58, p. 287-296, 2001.

ZHOU, H.; ZHANG, Y. Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 28, p. 235-242, 2005.