

## MELATONINA: EFEITOS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Izabella Ferreira Queiroz<sup>1,2</sup>  
Andressa Rodrigues Amorim<sup>1</sup>  
Cíntia Rodrigues da Silva<sup>3</sup>  
Giovana Barros Nunes<sup>3</sup>  
Gisele Zoccal Mingoti<sup>4</sup>  
Priscila Chediek Dall'Acqua<sup>5</sup>

**Resumo:** A melatonina é um potente antioxidante, tem sido usado com sucesso durante a maturação *in vitro* (MIV) para proteger os oócitos de espécies reativas de oxigênio (EROs), melhorando a capacidade de fertilização e de desenvolvimento embrionário. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi fazer uma revisão da literatura sobre o emprego da melatonina na produção *in vitro* de embriões bovinos, utilizando a base de dados do Google Acadêmico, com as seguintes estratégias de busca: Antioxidante, Estresse Oxidativo, Produção *In Vitro*, Biotecnologia. Durante a produção *in vitro* de embriões (PIVE), as células são expostas a fatores ambientais que induzem à produção de EROs, as quais atuam como importantes moléculas sinalizadoras. Porém, quando em excesso, as EROs são capazes de alterar a homeostase celular e podem causar apoptose, essa condição é denominada estresse oxidativo. Por isso, na tentativa de evitar o estresse oxidativo, controlando o excesso de EROs, antioxidantes vêm sendo empregados na PIVE. Nesse sentido, destaca-se o emprego da melatonina durante a MIV, pois além de contribuir com a redução do estresse oxidativo, é capaz de promover a maturação oocitária, com isso, é observado o aumento da clivagem e da produção de blastocistos. No entanto, o uso dessa substância deve ser feito com cautela, pois em concentração elevada pode ser tóxica para os oócitos, provocando retardo da maturação e diminuição do desenvolvimento embrionário. Em conclusão, é evidente que o uso da melatonina é capaz de contribuir para a melhoria dos resultados da PIV.

**Palavras-chave:** Antioxidante. Estresse Oxidativo. Maturação *In Vitro*.

### INTRODUÇÃO

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), é uma indolamina, derivada do aminoácido triptofano, encontrada em diversos compartimentos do organismo devido ao seu caráter anfifílico. Em mamíferos, além de ser produzida localmente em diversos tecidos, tem sua produção central pela glândula pineal (AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018). Portanto, devido a sua produção central e liberação no sangue, é considerada um neuro-hormônio que desempenha papel fisiológico importante na regulação do sono, da temperatura, no ritmo circadiano e na sazonalidade reprodutiva (REMIAO et al., 2016).

Evidencia-se, portanto, o papel multifuncional da melatonina, molécula esta que atua em diversas células por meio de receptores de membrana. No entanto, além da ação mediada por receptores, a melatonina também exerce um importante papel através da interação direta

<sup>1</sup> Discente do curso de Medicina Veterinária - UNIFIMES e-mail: izabella.fqueiroz@outlook.com

<sup>2</sup> Bolsista do programa PIBIC/UNIFIMES.

<sup>3</sup> Bolsista de Doutorado do Programa de Ciências Veterinárias – Reprodução Animal. FCAV-Unesp.

<sup>4</sup> Docente da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), Unesp.

<sup>5</sup> Docente do curso de Medicina Veterinária - UNIFIMES.

com algumas moléculas, sendo estas moléculas chamadas de radicais livres e a função desempenhada pela melatonina chamada de antioxidante (AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018). A melatonina é um dos mais poderosos antioxidantes naturais, não apenas por quelar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (radicais livres), mas também por mobilizar o sistema antioxidante enzimático intracelular. Devido a esta ação antioxidante é que o uso da melatonina em sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos vem sendo amplamente estudado, com o intuito de melhorar as taxas de desenvolvimento embrionário (TAMURA et al., 2009).

O uso da melatonina como antioxidante nos sistemas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) aponta resultados positivos como aumento nas taxas de maturação dos oócitos e nas taxas de desenvolvimento embrionário, adicionalmente notou-se aumento no número de células (blastômeros) nos blastocistos (TIAN et al., 2014). Tais melhorias podem ser explicadas através da capacidade protetora da melatonina, a qual desencadeia uma maior expressão de enzimas antioxidantes, as quais são responsáveis por neutralizar as espécies reativas de oxigênio, reduzindo a fragmentação nuclear (efeito anti-apoptótico) (RODRIGUES-CUNHA et al., 2016).

Os radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), são produtos do metabolismo celular normal, havendo um sistema (enzimático e não enzimático) responsável por manter a homeostase, ou seja, manter o equilíbrio de oxi-redução (redox), no qual os radicais livres em níveis considerados normais são necessários para o bom funcionamento do organismo como um todo (TAMURA et al., 2013). Situações adversas que levem a um desequilíbrio entre a produção e o *clearance* das EROs, provocam o acúmulo destas moléculas e, desta forma se instala a condição de estresse oxidativo (TAMURA et al., 2009).

Considerando que a produção *in vitro* de embriões possui condições de cultivo e processos de manipulação das células que podem levar ao estresse oxidativo, pode haver um desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes, desencadeando diversos danos aos oócitos e embriões via EROs, dentre os quais a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos direto ao DNA (TAMURA et al., 2013). Por isso, reforça-se a prática de incorporar substâncias com capacidade antioxidante na PIVE com o objetivo de manter o equilíbrio redox, importante para que a maturação e fertilização do oócito aconteçam de maneira adequada, bem como a produção de um embrião de qualidade (TAMURA et al., 2009).

Com essa finalidade, o uso da melatonina tem sido cada vez mais rotineiro nas práticas de PIVE, por ser um agente antioxidante de amplo espectro que possui como função eliminar

radicais livres, em virtude de promover uma maior expressão de enzimas antioxidantes e, pela ação antioxidante desempenhada por seus metabólitos (ZHAO et al., 2015).

Ainda, a melatonina tem ação promotora da maturação nuclear, provavelmente, por reduzir o efeito inibitório das EROs neste processo, em oócitos (ZHAO et al., 2015), preservando assim a função mitocondrial, a homeostase e protegendo contra o estresse oxidativo, reduzindo eventos apoptóticos e a morte celular (TIAN et al., 2014).

Pelo exposto tornam-se evidentes os inúmeros processos metabólicos regulados pela melatonina e a sua importância na PIVE, especialmente na etapa de maturação *in vitro* (MIV), uma vez que ela desempenha papel importante na regulação desta etapa e ainda, promove efeitos benéficos na redução do estresse oxidativo, desta forma, atuando como um potente agente capaz de melhorar a capacidade de desenvolvimento e a qualidade destas células. Portanto, é de extrema relevância uma revisão de literatura a respeito da importância e do papel desempenhado pela melatonina na MIV pela sua importância na PIVE, o que pode contribuir com o desenvolvimento e sucesso da biotécnica. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão da literatura sobre os efeitos da melatonina na produção *in vitro* de embriões bovinos.

## **METODOLOGIA**

Este trabalho caracteriza-se por uma pesquisa bibliográfica descritiva acerca do emprego da melatonina na produção *in vitro* de embriões bovinos, com ênfase na maturação *in vitro*. Para tanto, foram utilizados trabalhos científicos encontrados na base de dados do Google acadêmico por meio das palavras-chave: Antioxidante, Estresse Oxidativo, Produção *In Vitro*, Biotecnologia e Reprodução Bovino. Foram utilizados trabalhos científicos do ano de 1998 ao ano de 2018.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

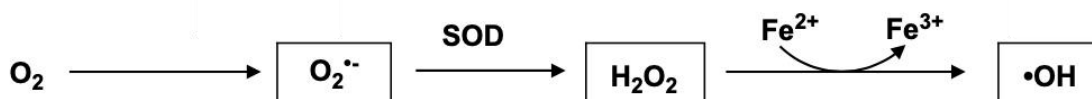
A maturação *in vitro* de oócitos constitui uma das principais etapas da produção *in vitro* de embriões, entretanto esta não apresenta a mesma eficiência da que ocorre *in vivo*, o resultado disso são as diferenças observadas com relação a quantidade e qualidade dos embriões produzidos em ambos os sistemas (LANDRY; SIRARD, 2018). Isso ocorre, pois durante a MIV, as células são expostas a diversos fatores, como a atmosfera gasosa, o meio de

cultivo, a temperatura, a suplementação proteica, os fatores de crescimento, dentre outros (SANTOS et al., 2002; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012). Tais fatores podem comprometer os eventos que compreendem a maturação nuclear, citoplasmática e molecular do oócito, essenciais para que este gameta adquira competência, podendo ser então fecundado e se desenvolver em um embrião saudável (COTICCHIO, 2016).

Sabe-se ainda que fatores ambientais (luz, radiação ultravioleta, tensão de oxigênio) e condições de incubação são capazes de desencadear o estresse oxidativo (NABENISHI et al., 2012) em função da maior produção de espécies reativas de oxigênio, as quais são originárias dos oócitos, embriões e das células do cumulus (GUÉRIN et al., 2001).

Com isso, durante a produção *in vitro* de embriões, por exposição das células aos fatores acima citados ocorre a formação excessiva de espécies reativas do oxigênio (EROs), oriundas da tensão suprafisiológica de oxigênio comumente utilizada nos sistemas de cultivo, da exposição à luz, bem como devido ao excesso de manipulação das células (GUERIN et al., 2001). As EROs são compostos químicos, derivados do oxigênio que apresentam pelo menos um elétron não compartilhado na camada de valência (SILVA et al., 2011), dentre elas, as de maior importância são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ), representados na Figura 1 (GUERIN et al., 2001).

**Figura 1:** Radicais livres originários da molécula de oxigênio.



**Legenda:** O oxigênio ( $O_2$ ) com a redução de um elétron forma o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) que é convertido, espontaneamente pela superóxido dismutase (SOD), em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual forma o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) na presença de metais de transição como o ferro e o cobre.

**Fonte:** adaptado de Tamura et al., 2009.

Quando presentes em baixas concentrações, as EROs desempenham funções fisiológicas importantes na PIVE, pois encarregam-se de sinalizar algumas funções celulares, especialmente, produção de energia, proliferação celular no desenvolvimento embrionário inicial, diferenciação celular e expressão gênica (BETTS; MADAN, 2008; LOPES et al., 2010). Todavia, quando em excesso, podem levar a danos celulares à membrana e ao DNA, que resultam em apoptose e bloqueio no desenvolvimento, além de disfunção mitocondrial em gametas e embriões, que podem inibir a fusão do espermatozoide com o oócito (VELEZ-PARDO et al., 2007; REMIAO et al., 2016).

Assim, podemos dizer que quando uma quantidade excessiva de EROs é liberada e não existem mecanismos de defesa capazes de controlá-las, ocorre o estresse oxidativo (ANDRADE *et al.*, 2010), desencadeando danos oxidativos dos componentes intracelulares que são deletérios à função celular e podem induzir a apoptose (YANG *et al.*, 1998; GUERIN *et al.*, 2001), decorrendo uma redução na produção e na qualidade embrionária.

Ainda que os complexos cumulos oócitos (da sigla em inglês COCs) sejam capazes de produzir seu próprio sistema de proteção antioxidante, secretando enzimas eliminadoras de EROs, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), ou moléculas captadoras intracelulares como a glutatona (DE MATOS E FURNUS, 2000), substâncias antioxidantes têm sido utilizadas em sistemas de produção *in vitro* com o intuito de reduzir os efeitos negativos decorrentes do estresse oxidativo no desenvolvimento e qualidade dos embriões.

Com o intuito de manter o equilíbrio redox e manter as funções fisiológicas dos oócitos, antioxidantes vem sendo utilizados na PIVE, especialmente na etapa de MIV, contrapondo o aumento das EROs na MIV (GUEMRA *et al.*, 2013). Esses antioxidantes, sejam eles de ação intra ou extracelular quando adicionados na MIV, diminuem a quantidade intracelular de EROs e a taxa de apoptose em embriões PIV (ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2014).

Um potente antioxidante, capaz de reduzir a apoptose que pode ser empregado com essa finalidade, é a melatonina (RODRIGUES-CUNHA *et al.*, 2016). A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é produzida a partir do aminoácido triptofano, não apenas na glândula pineal, mas também em outras partes do organismo como retina, glândula lacrimal extraorbital, trato gastrointestinal, pele e ovário. Este hormônio é bem conhecido por suas funções no controle do ritmo circadiano e sazonalidade reprodutiva, mas também desempenha um importante papel em várias funções fisiológicas por causa de suas propriedades imunomoduladoras e efeitos citoprotetores. Como antioxidante, é capaz de mobilizar o reparo do DNA, regulando diretamente a ação de várias enzimas antioxidantes, metabolismo oxidativo e transporte de elétrons (RODRIGUES-CUNHA *et al.*, 2016). Os mecanismos regulados pela melatonina no folículo ovariano estão sumarizados na Figura 2.

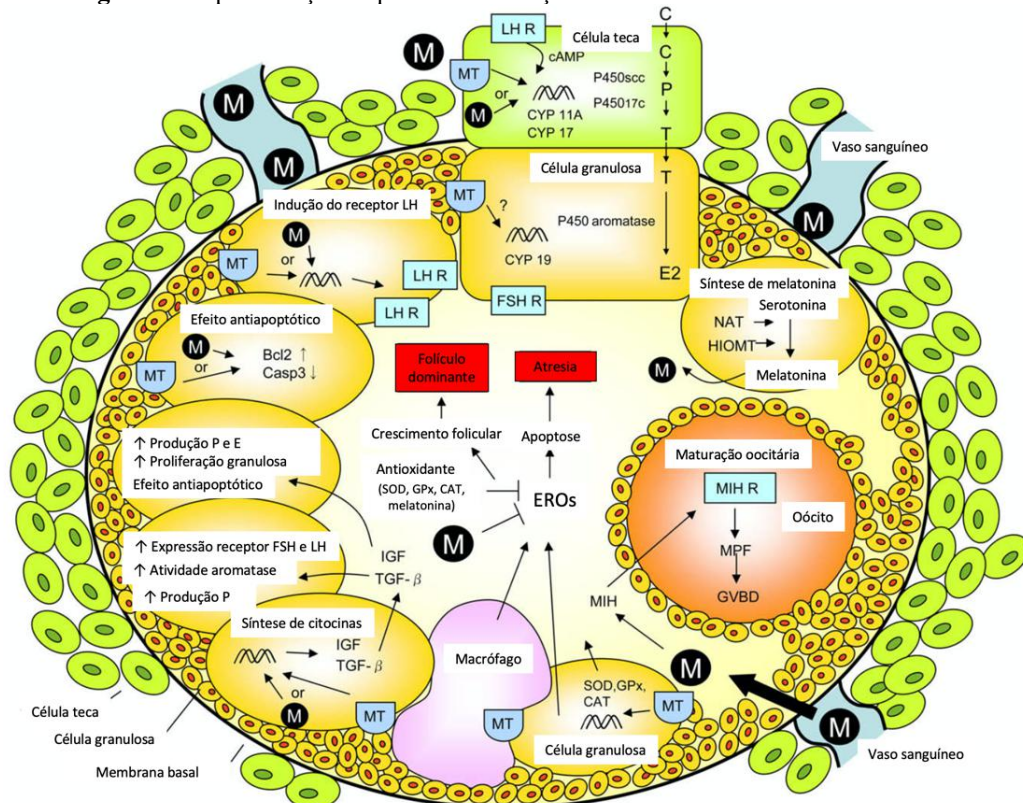
A ação antioxidante da melatonina não ocorre somente por ação direta da molécula, mas também pelos metabólitos formados durante sua interação com as EROs, além de ser mediada pela ativação de enzimas antioxidantes (TAMURA *et al.*, 2013), sendo esses outros efeitos mediados por receptores de membrana e/ou no núcleo (REITER *et al.*, 2007), expressos tanto nas células do cumulus quanto nos oócitos (TIAN *et al.*, 2014).

Apesar disso, altas concentrações de melatonina promovem efeitos deletérios

relacionados ao retardo da maturação e diminuição do desenvolvimento embrionário. No entanto, em concentrações mais baixas há incremento na maturação oocitária, revertendo em maiores taxas de clivagem e de blastocistos e estes com maior número total de células, o que indica melhor potencial de desenvolvimento embrionário (TIAN et al., 2014).

A ação da melatonina na maturação oocitária relaciona-se ao aumento da ação de LH e de proteínas semelhantes a EGF, pois ela promove uma regulação positiva dos receptores de membrana destas moléculas, favorecendo a maturação e a ovulação, além de desencadear a ativação de genes responsáveis pela expansão das células cumulus e reprogramação epigenética (TIAN et al., 2014). Ainda, observa-se a ação positiva da melatonina na redistribuição de mitocôndrias durante a maturação oocitária, uma vez que ela impede os danos causados aos microtúbulos pelas EROs e, estes são responsáveis pela divisão celular e reposicionamento das mitocôndrias; oócitos tratados com melatonina na MIV tendem a apresentar maior distribuição normal de mitocôndrias, característica importante para que ocorra uma adequada fertilização e desenvolvimento embrionário subsequente (ZHAO et al., 2018).

**Figura 2:** Representação esquemática das ações da melatonina no folículo ovariano.



**Legenda:** M=melatonina; MT=receptor de melatonina; LH R= receptor de LH; FSH R= receptor de FSH; C= colesterol; NAT= *N*-acetil-transferase; HIOMT= hidroxí-indole-*O*-metil-transferase; MIH= hormônio indutor da

maturação; MIF= fator promotor da maturação; GVBD= quebra da vesícula germinativa; EROs= espécies reativas do oxigênio; SOD= superóxido dismutase; GPx= glutathione peroxidase; CAT= catalase; IGF= fator de crescimento semelhante a insulina; TGF- $\beta$ = fator de crescimento transformador  $\beta$ .

**Fonte:** adaptado de Tamura et al., 2009.

Já o efeito da melatonina na maturação nuclear fica evidente quando oócitos maturados *in vitro* na presença de melatonina e na ausência de gonadotrofinas (FSH e LH), resultam em desenvolvimento embrionário semelhante àqueles maturados *in vitro* com hormônios gonadotróficos, entretanto sem a adição da melatonina (TAKADA et al., 2012).

Ainda, considerando a ação antioxidante da melatonina na redução de EROs em oócitos tratados durante a MIV (EL-RAEY et al., 2011; ZHAO et al., 2015), bem como seu possível efeito na maturação de oócitos, visto que a mesma é componente do fluido folicular de bovinos (TIAN et al.; 2014), e a possibilidade de utilizar a mesma na ausência de gonadotrofinas com similar desenvolvimento embrionário (TAKADA et al., 2012), sugere-se o uso dessa substância na MIV de oócitos bovinos, objetivando melhorar a maturação destes oócitos, bem como reduzir o estresse oxidativo decorrente do processo.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelo exposto, foi possível evidenciar a capacidade da melatonina em reduzir o estresse oxidativo na MIV, devido a mesma atuar como um antioxidante, neutralizando as EROs e reduzindo os efeitos deletérios destas na PIV, bem como seu potencial em promover a maturação oocitária mesmo na ausência de gonadotrofinas.

## REFERÊNCIAS

AMARAL, F. G.; CIPOLLA-NETO, J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 4, p. 472-479, 2018.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

BETTS, D. H.; MADAN, P. Permanent embryo arrest: molecular and cellular concepts. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, n. 8, p. 445-453, 2008.

COTICCHIO, G. IVM in need of clear definitions. **Human Reproduction**, v. 31, n.7, p. 1387-1389, 2016.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on the embryo development effect of beta mercaptoethanol, cysteine and cysteine. **Theriogenology**. v. 53, n. 3, p. 761–771, 2000.

EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; ABDEL-GHAFFAR, A. E.; SOSA, G. A.; EL-ROOS, M. E. A. A.; NAGAI, T. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. **Molecular Reproduction and Development**. v. 78, n. 4, p. 250-262, 2011.

GUEMRA, S.; MONZANI, P. S.; SANTO, E. S.; ZANIN, R.; OHASHI, O. M.; MIRANDA, M. S.; ADONA, P. R. *In vitro* maturation of bovine oocytes in medium supplemented with quercetin, and its effect on embryonic development. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 65, n. 6, p. 1616-1624, 2013.

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction**. v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.

LANDRY, D. A.; SIRARD, M. A. Follicle capacitation: a meta-analysis to investigate the transcriptome dynamics following follicle-stimulating hormone decline in bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 4, p. 877-887, 2018.

NABENISHI, H.; OHTA, H.; NISHIMOTO, T.; MORITA, T.; ASHIZAWA, K.; TSUZUKI, Y. The effects of cysteine addition during *in vitro* maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. **Zygote**. v. 20, n. 3, p. 249-259, 2012.

REITER, R. J.; TAN, D.; TERRON, M. P.; FLORES, L. J.; CZARNOCKI, Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. **Acta Biochimica Polonica**. v. 54, n. 1, p. 1-9, 2007.

REMIAO, M. H.; LUCAS, C. G.; DOMINGUES, W. B.; SILVEIRA, T.; BARTHER, N. N.; KOMNINO, E. R.; BASSO, A. C.; JORNADA, D. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; VARELA JUNIOR, A. S.; SEIXAS, F. K.; CAMPOS, V. F.; GUTERRES, S. S.; COLLARES, T. Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive Toxicology**. v. 63, p. 70-81, 2016.

RODRIGUES-CUNHA, M. C.; MESQUITA, L. G.; BRESSAN, F.; COLLADO, M. D.; BALIEIRO, J. C.C.; SCHWARZ, K. R. L.; CASTRO, F. C.; WATANABE, O. Y.; WATANABE, Y. F.; COELHO, L. DE A.; LEAL, C. L.V. Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. **Theriogenology**. v. 86, n. 7, p. 1685-1694, 2016.

ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; LEÃO, B. C. S.; NOGUEIRA, E.; ACCORSI, M. F.; MINGOTI, G. Z. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro* in the presence of antioxidants. **Reproduction Fertility and Development**. v. 26, n. 6, p. 797-805,



2014.

SANTOS, S. S. D.; DANTAS, J. K.; MIRANDA, M. S.; BIONDI, F. C.; OHASHI, O. M. Cinética da maturação nuclear *in vitro* de oócitos bubalinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 266-270, 2002.

SILVA, G. M.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE A. B. G.; LOPES, C. A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, p. 315-326, 2011.

TAKADA, L.; MARTINS JUNIOR, A.; MINGOTI, G. Z.; BALIEIRO, J. C. C.; CIPOLLANETO, J.; COELHO, L. A. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during *in vitro* maturation (IVM) and on *in vitro* embryo development. **Research in Veterinary Science**. v. 92, n. 1, p. 124-127, 2012.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D.; SUGINO, N.; REITER, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**. v. 92, n. 1, p. 328-343, 2009.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. **Endocrine Journal**. EJ12-0263, v. 60, p. 1-13, 2013.

TIAN, X.; WANG, F.; HE, C.; ZHANG, L; TAN, D.; REITER, R. J.; XU, J.; JI, P.; LIU, G. Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: a mechanistic approach. **Journal of Pineal Research**. v. 57, n. 3, p. 239-257, 2014.

VELEZ-PARDO, C.; MORALES, A. T.; DEL RIO, M. J.; OLIVERA-ANGEL, M. Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-kB and p53 activation in bovine embryos. **Theriogenology**. v. 67, n. 7, p. 1285-1296, 2007.

YANG, H. W.; HWANG, K. J.; KWON, H. C.; KIM, H. S.; CHOI, K. W.; OH, K. S. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Human Reproduction**, v. 13, n.4, p. 998-1002, 1998.

ZHAO, X. M.; MIN, J. T.; DU, W. H.; HAO, H. S.; LIU, Y.; QIN, T.; WANG, D.; ZHU, H. B. Melatonin enhances the *in vitro* maturation and developmental potential of bovine oocytes denuded of the cumulus oophorus. **Zygote**. v. 23, n. 4, p. 525, 2015.

ZHAO, X. M.; WANG, N.; HAO, H. S.; LI, C. Y.; ZHAO, Y. H.; YAN, C. L.; WANG, H. Y.; DU, W. H.; WANG, D.; LIU, Y.; PANG, Y. W.; ZHU, H. B. Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. **Journal of Pineal Research**. v. 64, n. 1, p. e12445, 2018.