

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

ALINNE GLORIA CURCIO DE ALBUQUERQUE

EFEITO DA TRICIRIBINA, UM INIBIDOR ESPECÍFICO DA AKT, NA MATURAÇÃO
IN VITRO DE COMPLEXOS *CUMULUS OOPHORUS* (COCs) E NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE BOVINOS

CAMPOS DOS GOYTACAZES

MAIO/2018

ALINNE GLORIA CURCIO DE ALBUQUERQUE

EFEITO DA TRICIRIBINA, UM INIBIDOR ESPECÍFICO DA AKT, NA MATURAÇÃO
IN VITRO DE COMPLEXOS *CUMULUS OOPHORUS* (COCs) E NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL DE BOVINOS

Tese apresentada ao Centro de
Ciências e Tecnologias
Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense
como requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciência
Animal.

ORIENTADOR: ANGELO JOSÉ BURLA DIAS

CAMPOS DOS GOYTACAZES

MAIO/2018

ALINNE GLORIA CURCIO DE ALBUQUERQUE

EFEITO DA TRICIRIBINA, UM INIBIDOR ESPECÍFICO DA AKT, NA MATURAÇÃO
IN VITRO DE COMPLEXOS *CUMULUS OOPHORUS* (COCs) E NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO
INICIAL DE BOVINOS

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Clara Slade Oliveira (Doutora, Medicina Veterinária) EMBRAPA-CNPGL

Dra. Helga Fernandes Gomes (Doutora, Biociências e Biotecnologia) UFRJ

Prof. Maria Clara Caldas Bussiere (Doutora, Fisiologia da Reprodução) UENF

Professor Angelo José Burla Dias (Doutor, Biociências e Biotecnologia) – UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força para prosseguir e a coragem de todas as manhãs;

Ao meu marido por ser meu pilar, meu sustento e estar comigo sempre, como manda o figurino, na alegria e na tristeza, nos prêmios e nos experimentos da madrugada;

Aos meus pais pelo incentivo e por ter me ajudado a chegar até aqui;

Ao meu orientador, Angelo Burla, por todo conhecimento e carinho transmitido e pelas incontáveis vezes que sorrimos e choramos juntos;

À família LRMGA. Às técnicas Bruna, Carla e Vânia pelo apoio científico e também pela amizade;

Aos meus pupilos, meus filhos da ciência, que estiveram comigo durante boa parte da jornada. Tainara, Hiago, Jaciara e Laura, obrigada pelas risadas, amizade e por me ensinarem a ensinar;

Ao meu amigo Valter Maciel por toda contribuição científica e companheirismo;

À professora Maria Clara pela amizade e apoio científico;

À professora Celia Quirino pela paciência e ajuda com a estatística, além das boas conversas em sua sala;

Aos amigos do LBR em especial ao Fabrício pela ajuda nos experimentos e contribuição científica;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pelo apoio financeiro;

Aos trabalhadores dos abatedouros por toda colaboração e paciência conosco.

“As coisas que os olhos não viram, e o ouvido não ouviu,
e ainda não subiram ao coração do homem
é o que Deus preparou para aqueles que o amam.”

I Coríntios 2:9

RESUMO

A proteína quinase B ou Akt é uma serina treonina quinase que atua no metabolismo, no controle da sobrevivência e proliferação celular e no transporte de substâncias. Já foi demonstrado em algumas espécies que durante a maturação *in vitro* (MIV) a enzima está envolvida desde a retomada da maturação até a progressão ao estágio de metáfase II, mas poucos são os trabalhos que estudaram a participação da Akt durante a MIV de ovócitos bovinos. Por isso, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de triciribina, um inibidor seletivo da Akt, em diferentes aspectos da maturação ovocitária e na PIV de embriões bovinos. Os complexos *cumulus oophuros* (COCs) foram maturados *in vitro* por 22 horas em meio TCM 199, acrescido de 10% de SFB, 10g/mL de FSH, 5µg/mL de LH e 1% de penicilina/estreptomicina e suplementados com: 0 (controle), 1, 5, 10 e 20 µM de triciribina. O estágio de maturação nuclear e citoplasmática foram avaliados pela marcação com orceína acética e *Lens culinaris*-FITC, respectivamente. Os COCs foram fertilizados *in vitro* e cultivados por nove dias. As taxas de clivagem, produção de blastocisto e de eclosão foram determinadas nos dias três, sete e nove do cultivo *in vitro*, respectivamente. Ovócitos provenientes de COCs tratados com 1 µM de triciribina foram corados às 3, 6 e 9 horas de MIV para determinar a participação do inibidor no rompimento da vesícula germinativa. Para a quantificação do AMPc nos ovócitos e nas células do *cumulus* (CCs) os COCs foram tratados com 1 e 20 µM do inibidor. A exposição dos COCs a 1, 5 e 10 µM de triciribina não alterou o número de ovócitos maturados ($P < 0,05$), mas a concentração de 20 µM reduziu o número de ovócitos em MII com um conseqüente aumento de ovócitos em MI ($P < 0,05$). Esta concentração reduziu de forma pronunciada o número de ovócitos com grânulos corticais periféricos e as taxas de clivagem e de blastocistos ($P < 0,05$). Por outro lado, quando os COCs foram maturados em presença de 1 µM houve um aumento na PIVe ($P < 0,05$), mas esta concentração não foi capaz de alterar o momento da retomada da meiose ($P < 0,05$). Não houve diferença na concentração de AMPc intraovocitário entre os grupos experimentais nos tempos analisados ($P < 0,05$). Por outro lado, as CCs apresentaram um aumento na concentração deste nucleotídeo às 3 horas de MIV ($P = 0,08$) no grupo tratado com 1 µM do inibidor, quando comparado ao controle. Conclui-se que a via Akt participa dos eventos nucleares e citoplasmáticos da maturação *in vitro* de ovócitos bovinos, mas por mecanismos que não interferem na quebra da vesícula germinativa. A modulação da atividade da Akt de COCs

bovinos durante a MIV aumenta a PIV por mecanismos não elucidados neste trabalho, porém mais estudos são necessários para identificá-los.

ABSTRACT

Protein kinase B or Akt is a serine threonine kinase that acts in metabolism, control of cell survival and proliferation and substances transport. It has already been demonstrated in some species that during *in vitro* maturation (IVM), enzymes is involved since vesicle germinal break down (GVBD) until acquisition of metaphase II, but few studies evaluated the participation of Akt during bovine oocytes IVM. Therefore the aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of triciribine, a selective Akt inhibitor, on bovine oocyte maturation and IVP. *Cumulus* oophorus complexes (COCs) were matured *in vitro* in TCM 199 supplemented with 10% FCS, FSH 10 g/mL, LH 5 µg/mL and 1% penicillin/streptomycin. This maturation medium was supplemented with 0 (control), 1, 5, 10 and 20 µM of triciribine. IVM was performed in 100 µL drop (20 COCs/drop), submerged in mineral oil and maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air, at 38.5 °C, for 22 hours. Nuclear and cytoplasmic maturation were evaluated by acetic orcein and *Lens culinaris* staining, respectively. COCs were fertilized *in vitro* and cultured for nine days. The cleavage, blastocysts and hatch rates were determined on days three, seven and nine, respectively. Oocytes from COCs treated with 1 µM of triciribine were stained at 3, 6 and 9 hours of IVM to determine the participation of inhibitor on vesicle germinal breakdown (VGBD). Oocytes and *cumulus* cells from COCs *in vitro* matured with 1 and 20 µM of triciribine were used for AMPc quantification. COCs treated with 1, 5 and 10 µM of triciribine did not influenced the number of mature oocytes ($P>0.05$), but the treatment with 20 µM decreased the percentage of oocytes at MII and increases the number of oocytes at MI ($P<0.05$). This concentration also markedly reduced the number of oocytes with peripheral cortical granules (a characteristic of mature oocytes), cleavage and blastocyst rates ($P<0.05$). On the other hand, when COCs were matured in presence of 1 µM there was an increase in IVP ($P<0.05$), but this concentration was not able to alter GVBD. There was no difference on intra-oocyte cAMP levels between experimental groups in analyzed times ($P<0.05$). However, *cumulus* cells showed an increase in cAMP levels at 3 hours of IVM ($P = 0.08$) in 1µM treated group when compared to control. Therefore, it can be concluded that Akt participate of the nuclear and cytoplasmic maturation events. The modulation of Akt activity during IVM improves IVP by mechanisms not yet elucidated in this work. More studies are needed to identify them.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. OBJETIVOS	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1: Maturação <i>in vitro</i> (MIV) dos complexos <i>cumulus oophorus</i>	31
4.2: Avaliação do estágio de maturação nuclear.....	31
4.3: Produção <i>in vitro</i> de embriões	34
4.4: Avaliação da cinética de rompimento da vesícula germinativa	34
4.5: Avaliação da distribuição dos grânulos corticais	35
4.6: Quantificação da concentração do AMPc.....	36
4.9: Análise estatística	38
4.10: Delineamento experimental.....	38
5. Resultados	40
6. Discussão	47
7. Conclusões	53
8. Referências Bibliográficas	54

1. INTRODUÇÃO

A proteína quinase B, também chamada de Akt, é uma serina treonina quinase que apresenta três isoformas: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) e Akt3 (PKB γ). É reconhecida por participar de inúmeros processos biológicos envolvidos no metabolismo (SIMONS *et al.*, 2012), na sobrevivência e proliferação celular (KUO *et al.*, 2008) e no transporte de substâncias. Sua atividade é controlada pelo produto da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), o fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), que se liga ao domínio PH da enzima (domínio com homologia a peclistrina), possibilitando a fosforilação dos resíduos treonina 308 (Thr308) e serina 473 (Ser 473) da subunidade quinase (FABO e ASSELIN, 2014). A proteína quinase 3-fosfoinositídeo 1 (PDK1) participa da fosforilação do resíduo Thr 308 e o complexo alvo da rapamicina 2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*-mTORC2) da fosforilação do resíduo Ser 473. Estima-se que a Akt possua mais de mil alvos identificados e cerca de apenas 50 deles têm função conhecida (CECCONI *et al.*, 2012).

No ovário das fêmeas mamíferas a Akt participa desde o recrutamento dos folículos ovarianos para o crescimento e ovulação (RICHARDS e PANGAS, 2010) até a aquisição da maturação ovocitária (KAULOS *et al.*, 2006; HOSHINO e SATO 2008) e competência para o desenvolvimento embrionário (ANDRADE *et al.*, 2017).

Desde a vida fetal até a puberdade, os ovócitos encontram-se em um estágio conhecido como dictiado (ou vesícula germinativa) e a maturação nuclear é interrompida durante a prófase da primeira divisão meiótica (ADONA *et al.*, 2013). *In vivo*, a retomada da maturação ovocitária e o rompimento da vesícula germinativa ocorrem após a puberdade com o pico de LH durante o ciclo estral, já *in vitro*, a maturação ocorre de maneira espontânea após a punção do folículo e retirada do ovócito do ambiente folicular inibitório (EDWARDS, 1965).

Os mecanismos que controlam a retomada da meiose não estão totalmente elucidados, mas sabe-se que o AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) apresenta importante papel durante o processo (GILCHRIST *et al.*, 2016). Este mensageiro é produzido pelas células do *cumulus* e da granulosa quando estimuladas pelo FSH (MATTIOLI *et al.*, 1994; GRISWORLD *et al.*, 1995) e alcançam o ovócito por meio das junções do tipo GAP (KIDDER *et al.*, 2002). Em camundongos já foi demonstrado que parte do AMPc também pode ser produzido pelo próprio ovócito (MEHLMANN *et al.*, 2002). Com o pico de LH ou a retirada do ovócito do folículo há o fechamento das junções e uma redução abrupta da

concentração intraovocitária do AMPc, o que leva a redução da atividade da proteína quinase A dependente de AMPc (PKA). Com a redução da atividade de PKA segue uma cascata de eventos de fosforilação e desfosforilação de quinases que culmina com a ativação da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) e do fator promotor da fase M (MPF), com consequente retomada da maturação ovocitária (VAN DER HURK e ZHAO, 2005).

Alguns trabalhos já demonstraram a participação da via PI3K/Akt na maturação de ovócitos em *Xenopus* (ANDERSEN *et al.*, 1998), em camundongos (OKUMURA *et al.*, 2002; HOSHINO *et al.*, 2008) e em suínos (KAULOS *et al.*, 2009), mas em bovinos são poucos os trabalhos na área. Em 2005, Tomek *et al.* verificaram que os níveis de fosforilação da Akt foram maiores após 10 horas da MIV e que a enzima participa da progressão do estágio de metáfase I (MI) para metáfase II (MII), pois quando um inibidor da Akt, o SH6 [D-2,3-dideoxy-my o-inositol1-[(R)-2-methoxy-3-octadecyloxy], foi utilizado durante 24 horas de MIV, houve um aumento do número de ovócitos em MI.

Andersen *et al.* (1998) demonstraram que em *Xenopus* um dos alvos da via PI3K/Akt durante a maturação ovocitária é a enzima fosfodiesterase (PDE). Segundo estes autores, a injeção intracitoplasmática de RNAm de Akt ativa aumentou a atividade de PDE e estimulou a retomada da maturação. A Akt quando ativa fosforila a PDE aumentando sua atividade, e esta última, por sua vez, catalisa a transformação do AMPc em AMP, inativando-o. É possível que esse mecanismo possa atuar cooperando com a redução abrupta dos níveis de AMPc durante a retomada da maturação ovocitária.

Tem sido demonstrado que quando ovócitos são maturados *in vitro* pode haver uma falta de sincronia entre a maturação nuclear e a maturação citoplasmática. Este fato pode ser devido à redução abrupta dos níveis de AMPc. Isto pode comprometer a qualidade da maturação ovocitária e consequentemente a produção *in vitro* de embriões. Neste sentido tem crescido o número de trabalhos utilizando inibidores de enzimas que participam da maturação nuclear, na tentativa de entender o papel de algumas quinases durante a MIV e para obter melhor sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática. Trabalhos anteriormente desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que a inibição da PI3K utilizando o *wortmannin* durante a MIV aumentou o número de ovócitos em metáfase I, mas apesar disso, houve um aumento da produção *in vitro* de blastocistos (GOMES, 2010; PEREIRA, 2014). É possível que o uso de inibidores da via PI3K/Akt promova uma regulação da atividade de enzimas da via durante a queda dos níveis de AMPc, levando a uma melhora na sincronia entre a maturação nuclear e a citoplasmática.

Em mamíferos são escassos os trabalhos utilizando inibidores específicos de Akt durante MIV. Algumas drogas estão disponíveis no mercado, mas muitas delas vêm sendo estudadas com o objetivo de tratar alguns tipos de neoplasias. A Triciribina[®] Merck é um inibidor seletivo das três isoformas da Akt. Seu uso reduziu significativamente o crescimento do insulinoma e do tumor de células endócrinas do intestino em 59 e 65%, respectivamente (GLOESENKAMP *et al.*, 2012), porém seu uso durante a maturação *in vitro* de ovócitos ainda não havia sido investigado.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inibição direta da Akt, utilizando a Triciribina[®] durante a maturação *in vitro* de complexos *cumulus oophorus* de bovinos, buscando entender seu efeito sobre diferentes aspectos da maturação nuclear e citoplasmática e determinar o impacto do tratamento sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos. O conhecimento adquirido pode, não só, resultar em um maior número de embriões bovinos produzidos *in vitro*, como também servir de base para um melhor entendimento da participação da via PI3K/AKT na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

2. OBJETIVO GERAL

2.1. Determinar o efeito da triciribina, um inibidor específico da Akt, na maturação *in vitro* de complexos *cumulus oophorus* (CCOs) de bovinos e seu impacto na produção *in vitro* de embriões.

2.2: OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1: Determinar o efeito da exposição dos CCOs a diferentes concentrações de triciribina, sobre a cinética de maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos bovinos;

2.2.2: Pesquisar o impacto da maturação *in vitro* de CCOs bovinos em meio suplementado com triciribina na produção *in vitro* de embriões;

2.2.3: Determinar o efeito da exposição dos CCOs a triciribina na concentração de AMPc em ovócitos e nas células do *cumulus*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1: ASPECTOS GERAIS DA MATURAÇÃO OVOCITÁRIA

3.1.1: Ovogênese e foliculogênese

Durante a vida embrionária, células germinativas primordiais (2n) que migraram para as cristas germinativas, diferenciam-se em ovogônias e realizam sucessivas divisões mitóticas para povoar a gônada ainda em formação. No fim das divisões mitóticas, as ovogônias aumentam de tamanho, diferenciam-se em ovócitos primários (2n) e entram na primeira divisão meiótica, que logo será interrompida no estágio de diplóteno da prófase da primeira meiose (PAULINI *et al.*, 2014). Estes ovócitos são então envolvidos por uma camada de células da granulosa não diferenciadas que formam os chamados folículos primordiais, que constituem a reserva de estruturas ovarianas que serão utilizadas durante a vida reprodutiva da fêmea. Os folículos primordiais são então recrutados para a maturação folicular de maneira independente de gonadotrofinas, as células da granulosa tornam-se cubóides e estes folículos são então chamados de folículos primários (VAN WEZEL e RODGERS, 1996). No folículo secundário há a formação de várias camadas de células da granulosa e a deposição inicial do material que formará a zona pelúcida em torno do ovócito (HULSHOF *et al.*, 1994). Os folículos secundários são responsivos às gonadotrofinas e por isso podem prosseguir para o próximo estágio de desenvolvimento, a formação do folículo terciário (AERTS e BOLS, 2010).

No folículo terciário ocorre a formação do antro, uma cavidade contendo o líquido antral, uma importante fonte de moléculas reguladoras como o AMPc e o GMPc, hormônios, fatores de crescimento, enzimas e lipoproteínas que são derivadas do sangue e das células da granulosa e das células do *cumulus*, que integram o folículo. O mecanismo de formação do antro ainda não está bem elucidado, mas sabe-se que *in vitro* o FSH e fatores semelhantes à insulina participam do processo (RODGERS e RODGERS, 2010). Os folículos passam então por uma fase de crescimento, recrutamento e seleção, com a formação de receptores para LH nas células da granulosa. Então, na puberdade, por meio da ação de gonadotrofinas, ocorre a

retomada e progressão da meiose até o estágio de metáfase da segunda meiose (MII), liberação do primeiro corpúsculo polar e consequente formação do ovócito secundário, que está apto à fertilização. Após a fecundação há novamente a retomada da meiose com a extrusão do segundo corpúsculo polar e formação do ovócito com cromossomos de apenas uma cromátide cada, que sofrerá singamia com o pronúcleo masculino (ADONA *et al.*, 2013).

A este processo de capacitação do ovócito para a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial dá-se o nome de maturação ovocitária, que envolve não só a maturação nuclear, com a formação da placa metafásica, mas também a maturação citoplasmática e a molecular (FERREIRA *et al.*, 2009).

3.1.2: Maturação nuclear

Os folículos ovarianos constituem uma reserva finita que deve ter sua utilização controlada de maneira eficiente, já que o crescimento folicular é um processo irreversível, e em geral os que não completarem o desenvolvimento culminando com a ovulação, sofrerão atresia (JOHN *et al.*, 2008). Os mecanismos moleculares responsáveis pelo bloqueio e pela ativação da maturação ovocitária não estão totalmente elucidados, porém sabe-se que a interrupção da comunicação entre as células do *cumulus* e o ovócito e consequente redução da oferta de importantes mensageiros responsáveis pela parada meiótica é um fator determinante para a retomada da maturação. *In vivo*, o pico de LH leva ao fechamento das junções comunicantes e consequente retomada da meiose e progressão até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica. Já *in vitro*, a retomada da meiose acontece espontaneamente após a retirada dos folículos do ambiente folicular inibitório e consequente fechamento das junções (GILCHRIST *et al.*, 2016).

Em camundongos já foi demonstrado que o pico de LH leva ao fechamento das junções comunicantes formadas pela conexina 43, de uma forma dependente da fosforilação da MAP quinase (MAPK), o que leva a interrupção da comunicação entre células do *cumulus* e ovócito (CONTI *et al.*, 2012). As junções comunicantes são regiões especializadas em membranas opostas de células vizinhas, formadas por proteínas pertencentes à família das

conexinas que se organizam em hexâmeros dispostos em pares, formando canais de comunicação entre células adjacentes distribuídos ao longo de membranas opostas. No COC, as junções estabelecem a comunicação entre células do *cumulus* e entre o ovócito e células do *cumulus*, o que permite a passagem de importantes substâncias de baixo peso molecular (até 1Kda) relacionadas ao metabolismo e ao controle do ciclo celular (PANT *et al.*, 2005).

Dentre os metabólitos ofertados pelas células do *cumulus*, o AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) tem uma grande importância na maturação ovocitária devido à sua relação com algumas quinases na manutenção da parada meiotica. No COC, o AMPc é predominantemente sintetizado nas células do *cumulus* e da granulosa quando estimuladas pelo FSH, que por meio de um receptor GTP, ativa a adenilato ciclase (AC) levando a produção do AMPc (adenosina 3',5' monofosfato cíclico) a partir do ATP (adenosina trifosfato) (SHIMADA, 2013). Parte do AMPc intraovocitário é produzido pelos ovócitos, porém tais mecanismos não estão completamente elucidados. Em 2002, MEHLMANN *et al.* demonstraram que receptores do tipo 3 acoplados à proteína G (GPR3), que ativam a adenilato ciclase, participam da manutenção da parada meiótica no estágio de VG. Mehlmann *et al.* (2004) demonstraram ainda que camundongos *knock out* para o receptor GPR3 retomam a meiose de uma maneira independente do LH e este fenótipo pode ser revertido por meio da injeção intraovocitária de RNAm para GPR3.

A enzima fosfodiesterase (PDE) também participa da regulação dos níveis intraovocitários de AMPc, convertendo esse nucleotídeo em 5'AMP. Seu papel na manutenção do estágio de vesícula germinativa já foi demonstrado em camundongos (BORNSLAEGGER *et al.*, 1985), suínos (SASSEVILLE *et al.*, 2008), bovinos (THOMAS *et al.*, 2004), primatas (JENSEN *et al.*, 2002), entre outros. A enzima apresenta diferentes isoformas que parecem variar entre as espécies ou conforme o compartimento folicular. Em bovinos, por exemplo, a PDE3 A ou B é encontrada no ovócito, enquanto que a PDE4 é predominantemente expressa nas células do *cumulus* (THOMAS *et al.*, 2002).

Uma das formas de controle da atividade da PDE é por meio da ação da guanosina monofosfato cíclica (GMPc), outro nucleotídeo cíclico produzido nas células do *cumulus* e da granulosa e transferido para o ovócito via junções comunicantes (NORRIS *et al.*, 2009). A afinidade da PDE para AMPc e GMPc é similar, porém o GMPc é hidrolizado a uma taxa de apenas 10% da observada para o AMPc. Dessa forma, a presença de maiores quantidades de GMPc aumenta os níveis intraovocitários de AMPc por ocuparem os sítios catalíticos dessa enzima (FRANCIS *et al.*, 2011). Zhang *et al.* (2010) demonstraram que em camundongos, as

células do *cumulus* são estimuladas pelo peptídeo natriurético tipo C (NPPC) para produzir o GMPc. Em bovinos os peptídeos natriuréticos tipo A e C também estimularam a produção de GMPc, mas curiosamente estimularam a retomada da meiose inibida por forskolin, um inibidor de PDE. Outra forma de controle da PDE é por meio da via PI3K/Akt, na qual a Akt fosforila e aumenta a atividade de PDE.

As elevadas concentrações de AMPc intraovocitárias mantêm o estágio de vesícula germinativa e a diminuição da concentração deste mensageiro está relacionada a uma cascata de eventos bioquímicos que culminam com a ativação do MPF e consequente retomada da meiose. O MPF também conhecido como CDK1 (*Cyclin-dependent kinase-1* ou quinase dependente de ciclina) é um regulador universal da divisão celular de células eucariotas. É uma ciclina dependente de quinase formada por duas subunidades: uma unidade catalítica, p34(cdc2) e uma unidade regulatória, a ciclina B. Sua atividade é controlada durante o ciclo celular de acordo com o acúmulo e degradação de ciclinas e por proteínas regulatórias, podendo assim estar na forma fosforilada e inativa (pré-MPF) ou desfosforilada e ativa (VAN DER HURK e ZHAO 2005).

Com a redução da oferta de AMPc há uma redução da atividade da proteína quinase dependente de AMPc (PKA), umas das principais responsáveis por manter a parada meiótica em ovócitos mamíferos (KOVO *et al.*, 2006). Com a redução da atividade desta quinase há um aumento da atividade de Mos, uma serina treonina quinase exclusiva de células germinativas e derivada do proto-oncogene c-mos (GEBAUER e RICHTER, 1996; DUPRÉ *et al.*, 2010). As Mos quinases, por sua vez, controlam a atividade de MEK, também chamada de MAPK-ERK kinase 1 ou MEK1, que fosforila e ativa a MAPK (GARDNER *et al.*, 1994). As ERK (*Extracellular signal-regulated protein kinases*) são quinases encontradas em ovócitos mamíferos sob duas isoformas, ERK1 (p44) e ERK2 (p42), sendo esta última a isoforma predominante em ovócitos bovinos (Figura 01). É importante destacar que estes mecanismos estão bem elucidados em roedores e em *Xenopus*, mas pouco conhecimento está disponível em animais de produção (VAN DER HURK e ZHAO, 2005; FAN e SUN, 2004).

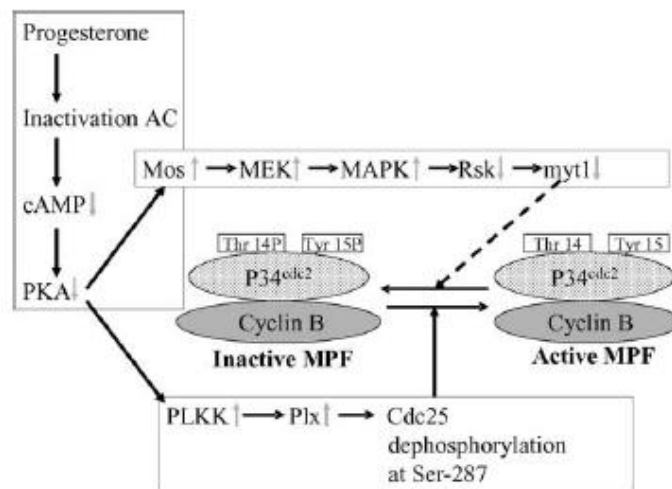


Figura 01: Mecanismo ativado pela progesterona que controla a ativação do MPF em ovócitos de *Xenopus*. O mecanismo envolve a ativação da MAPK por meio da redução da atividade da PKA dependente de AMP, que resulta na ativação de Mos e MEK. A ativação de MAPK leva a ativação do MPF por meio da inibição do Myt1, a quinase responsável pela fosforilação inibitória da Cdc2 nos resíduos treonina-14 e tirosina-15. Outro mecanismo envolve a ativação de polo like quinases que aumenta a atividade de MPF por meio da desfosforilação de Cdc2 no resíduo serina 287. Fonte: VAN DER HURK e ZHAO, 2005.

A cascata de regulação Mos/MEK/MAPK é considerada um regulador crítico da divisão meiótica devido ao seu controle sobre o MPF, já que com a ativação da MAPK, por meio da inibição de Myt1, ocorre a ativação do MPF. A MAPK em bovinos torna-se ativa próximo ao momento de quebra da vesícula germinativa mantendo-se em elevados níveis durante a transição MI/MII. Outro mecanismo que parece cooperar com a ativação do MPF envolve a participação das polo like quinases (PLKK) por meio da desfosforilação de Cdc25 no resíduo serina 287 (VAN DER HURK e ZHAO, 2005).

Após a ativação, a atividade do MPF oscila entre as divisões celulares. Este complexo apresenta alta atividade em ovócitos no reinício das divisões meióticas, alcançando seu maior nível na meiose I. No fim da meiose I, durante a transição da anáfase para a telófase, há uma diminuição da atividade do MPF e liberação do primeiro corpúsculo polar. Com o reinício da meiose II há um novo aumento da atividade de MPF e o ovócito alcança o estágio de metáfase II. O ovócito permanece então, do estágio de metáfase II até o momento da fertilização quando há uma nova retomada do ciclo celular com a liberação do segundo corpúsculo polar (BRUNET e MARO, 2005).

3.1.3: Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática consiste na redistribuição das organelas no citoplasma ovocitário preparando-o para a fertilização (FERREIRA *et al.*, 2009). Durante a maturação citoplasmática, as mitocôndrias, por exemplo, deixam as regiões periféricas do ovócito e movimentam-se para áreas de grande demanda de energia, as regiões mais centrais próximas ao núcleo (HYTTEL *et al.*, 1986) e tal movimentação é mediada pelos microtúbulos (SUN *et al.*, 2001). Estas organelas são encontradas em elevado número em ovócitos mamíferos e sua distribuição citoplasmática antes e depois da MIV está altamente relacionada à qualidade ovocitária, o que influencia diretamente a qualidade embrionária (STOJKOVIC *et al.*, 2001).

Assim como as mitocôndrias, as gotas lipídicas tendem a migrar da periferia em direção ao núcleo, provavelmente, como garantia da oferta energética para o desenvolvimento inicial de mamíferos (HYTTEL *et al.*, 1997). É possível que a correlação entre as mitocôndrias e as gotas lipídicas seja favorável a β -oxidação (DUNNING *et al.*, 2014).

O retículo endoplasmático regula as concentrações de cálcio intracelular, outro importante modulador da maturação. O pico de LH estimula o rápido aumento do cálcio intracelular nas células do *cumulus* pela ativação da fosfolipase C, um influxo de cálcio do meio extracelular e a síntese de ciclinas e, possivelmente, de outras proteínas do ciclo celular. Tem sido proposto que a modificação das ciclinas pelo sinal de cálcio é requerida para a ativação completa do MPF. O retículo controla ainda o estoque Ca^{++} que será utilizado na ativação celular após a fertilização. Após a VGBD, o retículo é encontrado na região cortical dos ovócitos e ao longo da maturação forma pequenos clusters distribuídos em todo o citoplasma, exceto ao redor do fuso (FERREIRA *et al.*, 2009).

Os ribossomos são sintetizados pela transcrição de RNAs mensageiros ribossomais (rRNA) e são responsáveis pela síntese proteica. Eles podem ser encontrados livres no citosol ou associados ao retículo endoplasmático, formando assim o retículo endoplasmático rugoso (HITTEL *et al.*, 2001).

O complexo de Golgi, por sua vez, encontra-se co-localizado ao retículo endoplasmático. Durante o estágio de vesícula germinativa o complexo de Golgi apresenta-se como estruturas semelhantes a fragmentos, já após a VGBD, são semelhantes a vesículas e são encontrados próximos ao núcleo. Ao fim do processo de maturação ovocitária estas organelas estão quase ausentes (MORENO *et al.*, 2002).

Os grânulos corticais são organelas secretórias, originárias do complexo de Golgi e dispostas na região cortical dos ovócitos mamíferos. Estes grânulos foram demonstrados pela primeira vez em 1956 por Austin e apresentam importante função pós-fertilização. No início da maturação estas organelas estão dispostas em aglomerados (*clusters*) e após a maturação alcançam distribuição justaposta à membrana plasmática para desempenhar importante função, o bloqueio a polispermia (HYTTEL *et al.*, 1986). Após a fertilização, os grânulos corticais liberam seu conteúdo proteico por exocitose no espaço perivitelínico levando a uma modificação na estrutura da zona pelúcida, de modo a impedir a fertilização do ovócito por mais de um espermatozoide, condição esta incompatível com o desenvolvimento embrionário (WANG *et al.*, 1997). Já foi demonstrado que a redistribuição dos grânulos corticais durante a maturação ocorre por meio do rearranjo de microfilamentos de actina (KIM *et al.*, 1996; CONNORS *et al.*, 1998; WESSEL *et al.*, 2002) e esta migração tem sido utilizada como um critério de verificação da maturação citoplasmática ((BARRETTO *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2017).

Além das organelas, os filamentos do citoesqueleto do ovócito – microtúbulos, microfilamentos de actina e os filamentos intermediários – alteram sua distribuição durante a maturação. Esses componentes apresentam importante função durante o processo, atuando na organização do fuso meiótico para a correta segregação dos cromossomos, liberação do corpúsculo polar, citocinese e no tráfico de substâncias e organelas (FERREIRA *et al.*, 2009). Os microtúbulos são formados a partir de subunidades de tubulina e logo após o rompimento da vesícula germinativa, formam uma pequena aster, próxima a cromatina condensada, que vai alongando-se e envolve o material genético. Durante o estágio de metáfase II, os microtúbulos organizam-se para formar o fuso da segunda divisão que culminará com a separação das cromátides irmãs. Os microfilamentos são formados de subunidades de actina que formam uma rede uniforme em torno do córtex celular e da cromatina (KIM *et al.*, 2000). Os filamentos intermediários são formados por subunidades de polipeptídeos arranjados de maneira análoga aos microtúbulos e microfilamentos de actina. Sua função não está totalmente elucidada, mas parece ser relacionada à resistência em resposta ao estresse.

3.1.4: Maturação molecular

A maturação molecular compreende a transcrição e o armazenamento de RNA mensageiros (RNAm) que serão traduzidos em proteínas pelos ribossomos, para serem utilizadas durante a maturação ovocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial. Após a VGBD a transcrição gênica é praticamente nula, sendo assim todo o RNAm e proteínas estocados serão traduzidos e utilizados no momento adequado durante a maturação e desenvolvimento embrionário inicial, até a ativação do genoma embrionário. (SIRARD, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Apesar de todo o conhecimento adquirido na área até os dias atuais, a eficiência na produção *in vitro* (PIV) de embriões resultantes de ovócitos maturados *in vitro*, é inferior a PIV a partir de ovócitos maturados *in vivo*. Este efeito pode ser devido à capacitação que os ovócitos dos folículos dominantes sofrem antes do pico de LH e que não ocorre nos ovócitos puncionados. Segundo Hittel (1999), quando ovócitos são coletados de folículos dominantes logo após o pico de LH e fertilizados *in vitro*, a taxa de produção *in vitro* de embriões alcança cerca de 50% de eficiência, porém quando ovócitos são obtidos de folículos de 2-6 mm, maturados e fertilizados *in vitro* a produção de embriões alcança somente cerca de 30% de eficiência.

Quando os ovócitos são puncionados do ambiente folicular, retomam a meiose e facilmente alcançam o estágio de metáfase II (MCGAUGHEY *et al.*, 1990), alcançando cerca de 80-90% de eficiência. Por outro lado, apenas 60-70 % dos ovócitos maturados *in vitro* atingem a chamada maturação citoplasmática (PAYTON *et al.*, 2004; MO *et al.*, 2014). Estes efeitos podem ser atribuídos à falta de sincronia entre a maturação nuclear e a citoplasmática (BILODEAU-GOESEELS, 2012). Assim, tem crescido o número de trabalhos utilizando moduladores de enzimas que participam da maturação (PARK *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017) e metodologias como o SPOM - *Simulated physiological oocyte maturation* – (ALBUZ *et al.*, 2010; GILCHRIST *et al.*, 2015), na tentativa de obter melhores condições de maturação

in vitro, melhor sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática e consequente aumento no número de embriões produzidos *in vitro*.

3.2: PARTICIPAÇÃO DA VIA PI3K/AKT NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS BOVINOS

As enzimas fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e a proteína quinase B, também conhecida como AKT, fazem parte de uma importante via enzimática, a via PI3K/Akt, a qual desempenha uma ação crítica na regulação de vários processos celulares, incluindo o controle do ciclo celular, diferenciação e sobrevivência celular, reparo do DNA, metabolismo celular e na síntese proteica. A via PI3K/Akt participa ainda do mecanismo de diversos processos patológicos em humanos, tais como o câncer (WU e HU, 2010; FRUMAN e ROMMEL, 2014) e diabetes. Além disso, a via tem uma participação importante na obesidade (YIN *et al.*, 2017) e no processo de envelhecimento (TZIVION e HAY, 2011; TROTT *et al.*, 2013).

A PI3K é uma quinase que fosforila o anel inositol de fosfolipídios. A família das quinases que fosforilam lipídios foi identificada nos anos 90 e atualmente é dividida em três classes (I, II e III), de acordo com suas características estruturais e afinidade pelo substrato. A classe I é a mais estudada e geralmente quando um efeito é atribuído a PI3K, está sendo referido à atividade dos membros desta classe.

A classe I se divide nos grupos A e B. A PI3K da classe IA é formada por uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A subunidade regulatória é responsável pela localização, ligação ao receptor e ativação da enzima, enquanto a subunidade catalítica fosforila o PIP2, formando o PIP3, o qual recruta os alvos *dowscream* da enzima. As enzimas da classe IB também são um heterodímero formado por duas subunidades: a p101, a subunidade regulatória, e a p110 γ , a subunidade catalítica. A classe IB é principalmente encontrada em leucócitos. As PI3K de classe II são formadas por uma única subunidade catalítica e utilizam o PI ou PI4 como substrato. As três isoformas são conhecidas como PI3KC2 α , PI3KC2 β e PI3KC2 γ . A função celular desta classe não é totalmente

conhecida. A classe III da família das PI3Ks também é formada por uma única subunidade catalítica, a Vps34, que produz somente o PIP3, um importante regulador do tráfego de substâncias na membrana plasmática, possivelmente por meio de sinais relacionados ao mTOR (*mammalian target of mTOR*). Supõe-se que as PI3K de classe III participem do controle da autofagia e a resposta celular para o acúmulo de nutrientes (para revisão DIENSTMANN *et al.*, 2014; JEAN e KIGER 2014).

A ativação da PI3K promove a fosforilação do grupo 3'-OH do anel inositol do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI(4,5)P2), um fosfolípido de membrana, catalisando sua transformação no fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PI(3,4,5)P3), que possui alta afinidade por proteínas com o domínio PH (domínio com homologia a pleckstrina), tais como a PDK1 e a AKT (LIETZKE *et al.*, 2000).

A participação da via PI3K/Akt na maturação de ovócitos é conhecida há alguns anos, principalmente em roedores e em *Xenopus* (ANDERSEN *et al.*, 1998; OKUMURA *et al.*, 2002; KANG e HAN, 2011), mas pouco se sabe da sua atuação na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos. Em 1997, Anas e colaboradores demonstraram pela primeira vez a participação da via PI3k/Akt na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos. Estes autores utilizaram diferentes doses de wortmannin e LY294002 [2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one], inibidores da PI3K, durante a MIV e observaram uma redução dose dependente do número de ovócitos que progrediram da meiose I para meiose II após 24 horas de maturação *in vitro*.

No ano de 2000, este mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que o tratamento dos ovócitos durante a MIV com 1000 nM de wortmannin não interferiu no rompimento da vesícula germinativa, mas alterou significativamente a atividade do MPF. Tanto nos grupos tratados, como naqueles não tratados houve um aumento progressivo do MPF até às 12 horas de cultivo. No grupo controle foi observada uma diminuição acentuada da atividade do MPF após as 14 horas de cultivo, e então houve um novo aumento atingindo níveis máximos após 20-24 horas de MIV. Por outro lado, quando o inibidor da PI3K foi utilizado, não houve declínio da atividade de MPF entre o intervalo de 12 às 24 horas, demonstrando assim, o papel da via PI3k/Akt na atividade do MPF e na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos (ANAS *et al.*, 2000).

Trabalhos do nosso grupo têm mostrado que a modulação da enzima PI3K, utilizando 20 nM do wortmannin, também levou a um aumento na porcentagem de ovócito em metáfase

I após 22 horas de MIV. Apesar disso, houve um aumento na produção *in vitro* de embriões (GOMES, 2010; PEREIRA, 2014).

Recentemente foi avaliado o efeito do FSH e da PI3K na viabilidade celular, na maturação ovocitária, no desenvolvimento embrionário, esteroidogênese e na expressão de importantes genes ligados a apoptose (BAX), a sobrevivência celular (BCL2), e a esteroidogênese (LHR, FSHR, CYP11A1, CYP19A1 e HSD17B1) nas células do *cumulus* e ovócitos. O FSH aumentou significativamente a taxa de maturação nuclear, mas a inibição de PI3K (100 μ M de LY294002) bloqueou a extrusão do primeiro corpúsculo polar, sem afetar a viabilidade ovocitária. Quando o inibidor de PI3K foi adicionado ao meio de MIV a produção de embriões não foi afetada, porém quando foi utilizado em conjunto com o FSH houve uma redução significativa no número de blastocistos produzidos. Com relação à esteroidogênese, a inibição de PI3K reduziu a produção de E2 e a relação E2/P4, tanto em presença como na ausência de FSH, e aumentou a produção de P4 somente na ausência de FSH. Nas células do *cumulus*, em presença de FSH houve superexpressão dos genes BAX e BCL2, e a inibição de PI3k afetou somente a expressão de BAX. Por outro lado, no ovócito, a inibição da PI3k levou a um aumento da expressão de BCL2 e redução da expressão dos genes LHR, FSHR, CYP11A1, CYP19A1 e HSD17B1 em meio sem FSH. Estes resultados confirmaram a participação da via na progressão da maturação e consequente extrusão do corpúsculo polar e demonstraram pela primeira vez o papel da via no controle da expressão de genes ligados a sobrevivência celular e esteroidogênese de COCs bovinos (DE SOUZA *et al.*, 2017).

Também foi demonstrada a participação da via na competência do desenvolvimento de ovócitos bovinos. Células obtidas de folículos cujos ovócitos se desenvolveram a blastocistos após ativação partenogênética, apresentaram reduzida atividade de PTEN, o que sugere uma *upregulation* da via PI3K/Akt nessas células (ANDRADE *et al.*, 2017).

Devido a esses achados, tem havido um crescente interesse da participação da via PI3K/Akt na reprodução de mamíferos, mais especificamente na maturação ovocitária, buscando incrementar os índices de produção *in vitro* de embriões (JOHN *et al.*, 2008; KAISER DE SOUZA *et al.*, 2017; ANDRADE *et al.*, 2017). Alguns estudos já demonstraram o efeito da inibição da PI3K na maturação de ovócitos, mas poucos trabalhos avaliaram o efeito da inibição direta da Akt.

3.3. AKT/PROTEÍNA QUINASE B (PKB)

A enzima Akt, também conhecida como proteína quinase B (PKB), pertencente à superfamília das proteínas serina/treonina é formada por três domínios: um domínio N-terminal com elevada homologia com a Pleckstrina, por isso chamado de domínio PH, um domínio quinase e um domínio C-terminal regulatório hidrofóbico (HOSHINO e SATO, 2008). A Akt foi identificada em 1997 e devido à sua homologia estrutural com a PKC (73%) e a PKA (68%), foi atribuído o nome PKB. Ao mesmo tempo, a quinase foi identificada como o produto do oncogene viral v-AKT, surgindo então o nome AKT. Os nomes AKT e PKB são igualmente utilizados (DOWNWARD, 1998).

A Akt apresenta três isoformas: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) e Akt3 (PKB γ) e suas funções não estão totalmente elucidadas, mas é possível que sinais isoforma-específicos, estejam relacionados às suas funções. Apesar da elevada homologia entre elas (80%), sua distribuição nos tecidos é heterogênea. A Akt1 é mais encontrada no cérebro, nos pulmões e no coração, a Akt2 na musculatura esquelética e na gordura do baço embrionário, enquanto a Akt3 é mais expressa nos rins, no cérebro e no coração embrionário (CECCONI *et al.*, 2012; FABI e ASSELIN, 2014).

Em camundongos, a Akt 1 parece estar relacionada à sobrevivência celular, já que camundongos *knock out* para essa isoforma da enzima mostraram falhas no desenvolvimento e pontos de apoptose em diferentes tecidos. Já a Akt 2 parece estar relacionada ao metabolismo da glicose, pois camundongos *Akt 2-knock out* desenvolveram diabetes. As funções da Akt 3 são pouco conhecidas, mas os camundongos *Akt 3-knock out* apresentaram falha no desenvolvimento cerebral (CECCONI *et al.*, 2012).

A Akt1 já foi identificada nas células da granulosa e em ovócitos de roedores (REDDY *et al.*, 2009), enquanto que em suínos, essa isoforma foi identificada em células da granulosa de folículos primordiais e em camadas basais dessas células em folículos pré-antrais e antrais, no entanto não foram encontradas em folículos atrésicos e em corpos lúteos. Em humanos, a Akt1 foi encontrada em folículos em todos os estádios de desenvolvimento e em células luteais (GOTO *et al.*, 2007), entretanto em bovinos, ainda não foram identificadas as isoformas presentes em ovócitos e células da granulosa.

A atividade da Akt é regulada pelo produto da enzima PI3K, o PI (3,4,5)P₃, que se liga à subunidade PH da enzima por meio da fosforilação dos resíduos Thr 308 e Ser 473 da subunidade quinase. É possível que sua localização na membrana seja necessária para sua função. A fosforilação do resíduo Thr 308 é dependente da proteína quinase 3- fosfoinositide dependente 1 (PDK1) e a fosforilação do resíduo Ser 473 do complexo, alvo da rapamicina 2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*-mTORC2). Tem sido demonstrado que a fosforilação do resíduo Ser 473 facilita a fosforilação da Thr 308, podendo determinar sua especificidade bem como sua ação (FABI e ASSELIN, 2014) (Figura 02).

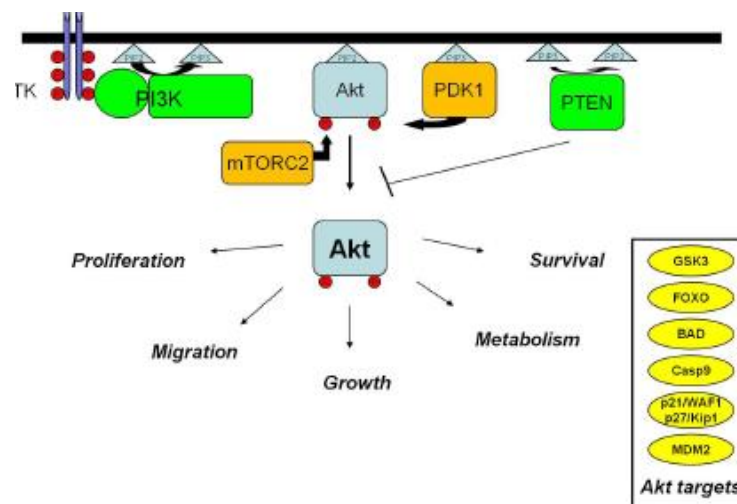


Figura 02: Desenho esquemático do mecanismo de ativação da Akt e alguns de seus alvos. Adaptado de CECCONI *et al.* (2012).

É possível que a Akt possua mais de mil substratos e apenas cerca de 50 deles tenham suas funções caracterizadas. Esta quinase foi inicialmente descrita devido à sua capacidade de regular a proliferação celular e a apoptose. Ela participa do controle da apoptose por regular a atividade de fatores transcricionais necessários para a expressão de moléculas anti e pró apoptóticas. Ela pode regular negativamente fatores pro-apoptóticos como caspase-9 e o BAD e regular positivamente alguns fatores de sobrevivência como o fator CREB, o óxido nítrico (BRAZIL *et al.*, 2002) e o fator nuclear- κ B (ROMASHKOVA e MAKAROV, 1999),

promovendo a sobrevivência celular. A Akt também controla a sobrevivência celular por meio da fosforilação direta dos membros da família Bcl-2 de fatores antiapoptóticos e por regular a expressão desses fatores (ADAMS e CORY, 1998).

A enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) e as proteínas da superfamília do FOXO (*Forkhead family of transcription factors*) são os alvos ovarianos mais estudados da Akt (CECCONI *et al.*, 2012). A GSK3 quando fosforilada pela Akt, torna-se inativada e deixa de fosforilar a glicogênio sintase (GS), levando a um aumento da utilização da glicose para a produção de glicogênio. Além disso, a GSK3 está envolvida na síntese de proteínas, na dinâmica de microtúbulos, proliferação e diferenciação celular (UZBEKOVA *et al.*, 2009). Em bovinos, a GSK3 já foi identificada em folículos ovarianos em diferentes estádios de desenvolvimento, e durante a maturação *in vitro* participa da progressão da meiose entre o estágio de MI-MII, possivelmente por um mecanismo envolvendo as Aurora quinases, além de atuar no metabolismo do ovócito e do embrião.

A Akt também participa do processo de recrutamento de folículos para o desenvolvimento e maturação. Tal mecanismo deve ser muito bem controlado por tratar-se de uma reserva finita de células germinativas e a depleção do *pool* de folículos primordiais estar relacionada a fenômenos como a menopausa e a falha ovariana prematura em mulheres. A PI3K/Akt participa deste processo por meio de um mecanismo envolvendo Kit-ligante (KL), expresso nas células do *cumulus*, e receptores KL, presentes no ovócito, e os fatores de transcrição pertencentes à família FOXO. Em camundongos, a ablação de Pten, um inibidor fisiológico da Akt, ocasionou a hiperativação desta enzima, e a hiperfosforilação de FOXO3, o que levou a ativação global de folículos primordiais e consequente falha ovariana prematura (JOHN *et al.*, 2008). Este efeito pode ser devido ao aumento da expressão do inibidor de ciclo celular p27 e prevenção de sua exportação para o citoplasma, garantindo o efeito inibitório desta proteína no núcleo (RICHARDS e PANGAS, 2010).

A participação da Akt na maturação ovocitária de mamíferos tem sido pouco explorada e até o momento não há um consenso sobre a participação da enzima na retomada e progressão da meiose entre as espécies. Em ovócitos de *Xenopus laevis* a injeção intraovocitária de RNAm codificante de Akt ativa induziu o rompimento da vesícula germinativa (VGBD) de modo semelhante ao obtido quando da indução por insulina e progesterona. Além disso, o tratamento praticamente duplicou a atividade da fosfodiesterase (PDE). A indução da VGBD pela injeção de RNAm codificante de Akt foi bloqueada em

presença de cilostamide, um inibidor de PDE 3A, sugerindo que PDE é um alvo distal da Akt na cascata enzimática que leva a retomada da meiose (ANDERSEN *et al.*, 1998).

Em camundongos, a ativação da Akt precede a VGBD, tanto na maturação *in vivo* como na *in vitro*, e a inibição da via PI3K/Akt levou a inibição da retomada da meiose e o uso de LY-294002, inibidor da via PI3K/Akt, reduziu a fosforilação de Akt e de CDK1, sugerindo que nesta espécie a Akt pode estar envolvida na ativação de CDK1 e na retomada da meiose (KAULOS *et al.*, 2006). Durante a progressão da meiose nesta espécie, a Akt fosforilada no resíduo Serina 473 (pAkt-Ser473) e a Akt fosforilada no resíduo treonina (pAkt-Thr308) agem de forma independente para que os ovócitos atinjam a maturação nuclear e a capacidade para a fertilização. A pAkt-Ser473 apresenta distribuição justaposta aos microtúbulos, enquanto que a pAkt-Thr308 foi localizada próxima ao material pericentriolar durante a metáfase I e II (HOSHINO, 2004) e o uso de anticorpos específicos para a pAkt-Ser473 comprometeu a extrusão do segundo corpúsculo polar. Quando anticorpos para pAkt-Thr308 foram utilizados houve extrusão do segundo corpúsculo polar, porém a distribuição de microtúbulos foi afetada e os cromossomos apresentaram alinhamento aberrante (HOSHINO e SATO, 2008).

Um estudo em estrelas-do-mar também demonstrou que a Akt está envolvida na retomada da meiose por meio da regulação negativa direta sobre o Myt1, que por sua vez, controla a fosforilação de CDK1 (OKUMURA *et al.*, 2002) (Figura 03).

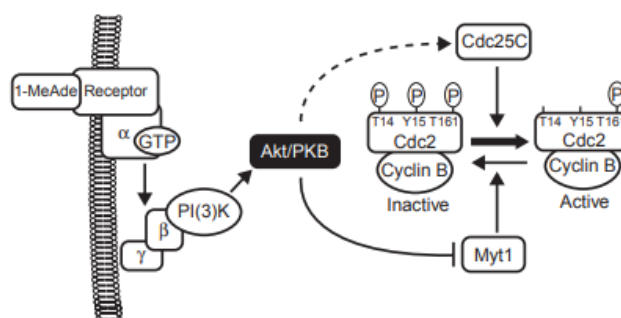


Figura 03: Modelo para a transição da fase G2/M em ovócitos de *Asterina sp.* Fonte: KUMURA *et al.* (2002).

Em suínos, a fosforilação dos diferentes resíduos da Akt também varia de acordo com o momento da meiose. Segundo Kaulos *et al.* (2009), a pAkt-Ser473 foi predominantemente

encontrada em ovócitos no estágio de vesícula germinativa e houve um aumento da atividade da enzima até o momento da VGBD e então houve uma queda repentina da fosforilação neste resíduo que se manteve em baixos níveis entre a metáfase I e II. Por outro lado, houve um aumento da fosforilação no resíduo treonina 308 no momento da VGBD e atingiu um pico no estágio de metáfase I.

Em bovinos, pouco se sabe sobre a participação desta via na progressão da meiose e consequente maturação de ovócitos. O único trabalho publicado até então utilizando a inibição direta da enzima mostrou que a atividade da Akt em bovinos se manteve constante entre os estádios de VG, MI e MII. Por outro lado, a fosforilação dos resíduos Thr308 e Ser473 aumentou após 10 horas de MIV, enquanto que em 0 e 24 horas de MIV, estavam em níveis basais, indicando que a Akt em bovinos está mais ativa no final da MI. Os autores relataram que a utilização do inibidor da Akt SH6, um análogo do fosfatidilinositol, reduziu a fosforilação da enzima em seus dois resíduos e aumentou o percentual de ovócitos que se apresentavam no estágio de MI (60%). Segundo esses autores a inibição foi reversível, pois, quando os ovócitos eram cultivados por 10 horas adicionais em meio livre do inibidor, 80% dos ovócitos atingiam o estágio de MII, não diferindo significativamente do grupo controle (TOMEK e SMILJAKOVIC 2005).

Curiosamente, um trabalho recente demonstrou o efeito da ativação de receptores canabinoides na fosforilação da Akt e de pERK1/2 durante a MIV de ovócitos bovinos. O sistema endocanabinoide (SEC), assim chamado por ter sido descoberto a partir dos efeitos dos extratos de plantas do gênero *Cannabis* sp no organismo, é responsável por participar da regulação de vários processos biológicos no organismo, incluindo a memória, cognição, gerenciamento de dor, humor, resposta imunológica, sono e apetite (PACHER et al., 2006). Os endocanabinoides são lipídios que atuam por meio de dois receptores, CB1 e CB2, que atuam para manter a homeostase. O SEC já foi identificado em folículos ovarianos de humanos e de roedores (SUN e DEY, 2012). Os receptores CB1 e CB2 já foram identificados em bovinos e o uso dos agonistas HU-210 e THC durante a MIV aumentou a fosforilação da AKT e de ERK1/2. A suplementação com os agonistas não aumentou a produção de blastocistos, mas aumentou a expressão de dois genes ligados à qualidade embrionária, o interferon tau (IFN τ) e *gap junction alpha-1 protein gene* (GJA1) (LÓPEZ-CARDONA et al., 2016).

Os achados nas diferentes espécies demonstram que a via PI3K/Akt apresenta importante papel na aquisição da maturação ovocitária, desde a retomada da meiose até a

extrusão do segundo corpúsculo polar. A via está ativa antes da retomada da meiose e participa do controle de importantes processos celulares como o arranjo dos microtúbulos, a extrusão do corpúsculo polar, e a fosforilação de quinases. O uso de inibidores da PI3K durante a MIV não inibiu a retomada da maturação, indicando que outros fatores são determinantes para o processo (pico de LH, rompimento das junções comunicantes e perda da inibição exercida pelo o GMPc), mas a via parece cooperar com a redução dos níveis de AMPc, já que quando ativa, a Akt fosforila a PDE aumentando sua atividade, contribuindo assim para a queda repentina deste mensageiro durante a retomada da maturação. Porém, nenhum trabalho mostrou o efeito da inibição direta da Akt na concentração intraovocitária de AMPc e a sua influência da retomada da meiose *in vitro*.

3.4. USO DE INIBIDORES DA VIA DE PI3K/AKT NA MATURAÇÃO OVOCITÁRIA

A utilização de inibidores enzimáticos durante a MIV de ovócitos tem sido utilizada como uma estratégia para entender o papel de certas enzimas durante a maturação ovocitária, e assim pode propor alternativas de controle de suas atividades, em uma tentativa de mimetizar o que ocorre *in vivo* e conseqüentemente aumentar o número de embriões produzidos *in vitro*.

Boa parte do conhecimento adquirido sobre a participação da Akt na maturação ovocitária foi obtida utilizando camundongos *knock out* (CECCONI *et al.*, 2012), o que para animais de produção tem o uso limitado devido ao elevado intervalo entre gerações.

O Wortmannin e o LY294002 [2-(4-Morpholinyl)-8- phenyl-4H-1-benzopyran-4-one] têm sido os inibidores mais utilizados para estudar a via Pi3/Akt nos diferentes tipos celulares. Apesar do LY294002 ainda ser utilizado em estudos para entender o papel da inibição da PI3K/Akt, sabe-se que ele não é um inibidor seletivo de PI3K, e pode atuar sobre outras lipídio quinases e outras proteínas como mTOR (mammalian target of rapamycin), DNA-PK (proteína quinase DNA dependente), CK2 (caseína quinase 2) e Pim-1 (Proto-oncogene serina/treonine-proteína quinase) (GHARBI *et al.*, 2007). O wortmannin, por outro

lado, é reconhecido como um inibidor específico, não competitivo e irreversível de PI3K em concentrações nanomolares (CARNERO E LACAL, 1998).

O SH6, um análogo do fosfatidilinositol, é um exemplo de inibidor seletivo da Akt utilizado durante a MIV. O seu uso durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos aumentou o número de ovócitos no estágio de MI, e a inibição foi reversível, pois quando os ovócitos foram cultivados em meio livre do inibidor, os ovócitos progrediram até o estágio de MII (TOMEK e SMILJAKOVIC 2005). Outro inibidor seletivo da Akt é o 10 DEBC (10-[4'-(N,N-Diethylamino)butyl]-2-chlorophenoxazine hydrochloride). Um estudo desenvolvido em nosso grupo demonstrou que o uso de 10 μM deste inibidor durante a MIV não alterou significativamente o número de ovócitos maturados e o número de blastocistos produzidos *in vitro* (GOMES, 2010).

A Akt tem sido muito estudada no intuito de entender melhor alguns tipos de neoplasias em humanos devido à sua capacidade de regular a proliferação celular e por estar envolvida em mecanismos apoptóticos. Alguns trabalhos apresentam resultados promissores no tratamento destas enfermidades e alguns deles encontram-se, até mesmo, em fase de testes clínicos (YAP et al 2011; SHIMIZU et al., 2012).

A triciribina (Merck, Darmstadt, Alemanha) é uma molécula pequena, de fórmula química $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_4$ e um inibidor seletivo das três isoformas da Akt, impedindo sua fosforilação. Seu uso (50-75 $\mu\text{mol/L}$) reduziu significativamente o crescimento do insulinooma e do tumor de células endócrinas do intestino em 59 e 65%, respectivamente (GLOESENKAMP *et al.*, 2012). Não há relatos da utilização da triciribina durante a maturação *in vitro* de ovócitos em mamíferos.

Lebedeva *et al.* (2015), utilizaram a triciribina (50 μM) e outros inibidores de quinases para estudar os efeitos diretos da prolactina (PRL) e do hormônio do crescimento (GH) sobre a metáfase II (M II) de ovócitos bovinos envelhecidos *in vivo* (ovócitos em MII cultivados por 44 horas adicionais em presença do inibidor). Segundo os autores, o uso da triciribina aumentou a taxa de ovócitos em metáfase II com anormalidades cromossomais quando comparado ao grupo não tratado. Não há dados na literatura da utilização deste inibidor durante a MIV de ovócitos bovinos, relacionado aos seus efeitos no rompimento da vesícula germinativa, na maturação nuclear e citoplasmática, no desenvolvimento embrionário inicial e nos níveis de fosforilação de quinases implicadas na maturação ovocitária e ainda na atividade do AMPc durante a retomada da meiose.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich (Sigma – Aldrich Co. LLC), exceto aqueles especificados no texto.

4.1: MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DOS COMPLEXOS *CUMULUS OOPHORUS*

Para obtenção dos complexos *cumulus oophorus* (COC), ovários obtidos em matadouros da região de Campos dos Goytacazes (RJ) foram transportados até o laboratório em garrafas térmicas e então lavados em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) acrescida de antibióticos [100 UI/mL de penicilina (P3032) e 100 µg/mL de estreptomicina (S1277)].

Folículos ovarianos de 2-6 mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de uma seringa com agulha 19 “G” (40 x 1,2 mm). O líquido folicular foi depositado em um tubo cônico de 50 ml e após 10 minutos de decantação, o precipitado foi aspirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para uma placa de Petri (Corning, 100 x 15 mm). Para auxiliar na busca e seleção dos COCs, foram adicionados à placa de Petri, 2 ml de meio de manipulação [Meio 199 Hapes (M2520), acrescido de 20 mM de bicarbonato de sódio (S-6297), 10%, soro fetal bovino (Cultilab), 100 UI/mL de penicilina (P3032) e 100 µg/mL de estreptomicina (S1277)]. Em seguida, foi realizada a busca e a classificação dos complexos *cumulus oophorus* de acordo com a sua morfologia e a disposição das células do *cumulus* (DE LOSS *et al.*, 1989). Apenas COCs classificados como graus I e II foram utilizados nos experimentos. Os COCs foram lavados três vezes em meio de manipulação e transferidos para o meio de maturação [meio-199 com sais de Earle (M-5017), acrescido de 20 mM de bicarbonato de sódio (S-6297), 5,0 µg/mL de LH (Lutropin-V, Bioniche, Beleville, Canadá), 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Bioniche, Beleville, Canadá), 0,2 mM de piruvato (P4562), glutamina (G8540), 100 UI/mL de penicilina (P3032) e 100 µg/mL de estreptomicina (S1277)]. Foi estabelecido o tempo limite de 1 hora para busca e seleção dos ovócitos. A maturação *in vitro* (MIV) foi realizada em gotas de 100µL do meio de maturação, cobertas com óleo mineral (M8410), acrescido de 1, 5, 10 ou 20 µM do inibidor da enzima Akt (Triciribina, Merck®), por 22 horas, em atmosfera úmida de 5% de CO₂, a 39°

C. COCs do grupo controle (GC) foram mantidos nestas mesmas condições, exceto pela ausência da triciribina.

4.2: AVALIAÇÃO DO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO NUCLEAR

Após 22 h da MIV, os ovócitos foram desnudados mecanicamente por meio de sucessivas pipetagens em solução de hialuronidase [hialuronidase 0,2 % (Hyalozima[®], Aspen), álcool polivinílico 0,1% (PVA - P8136), em PBS livre de Ca⁺²]. Em seguida foram colocados entre lâmina e lamínula e fixados em etanol/ácido acético (3:1) (Cromoline) por 48 horas. Então, foram mantidos por três minutos em uma solução de orceína acética 2% (Fluka - 75410) e observados em microscópio óptico (TE 300 - NIKON) para determinação do estágio de maturação nuclear, segundo a migração dos cromossomos. Os ovócitos foram classificados de acordo com a conformação que os cromossomos apresentavam em: vesícula germinativa (VG), anáfase e telófase (Anáf/Tel), metáfase I (MI) ou metáfase II (MII) (Figura 04).

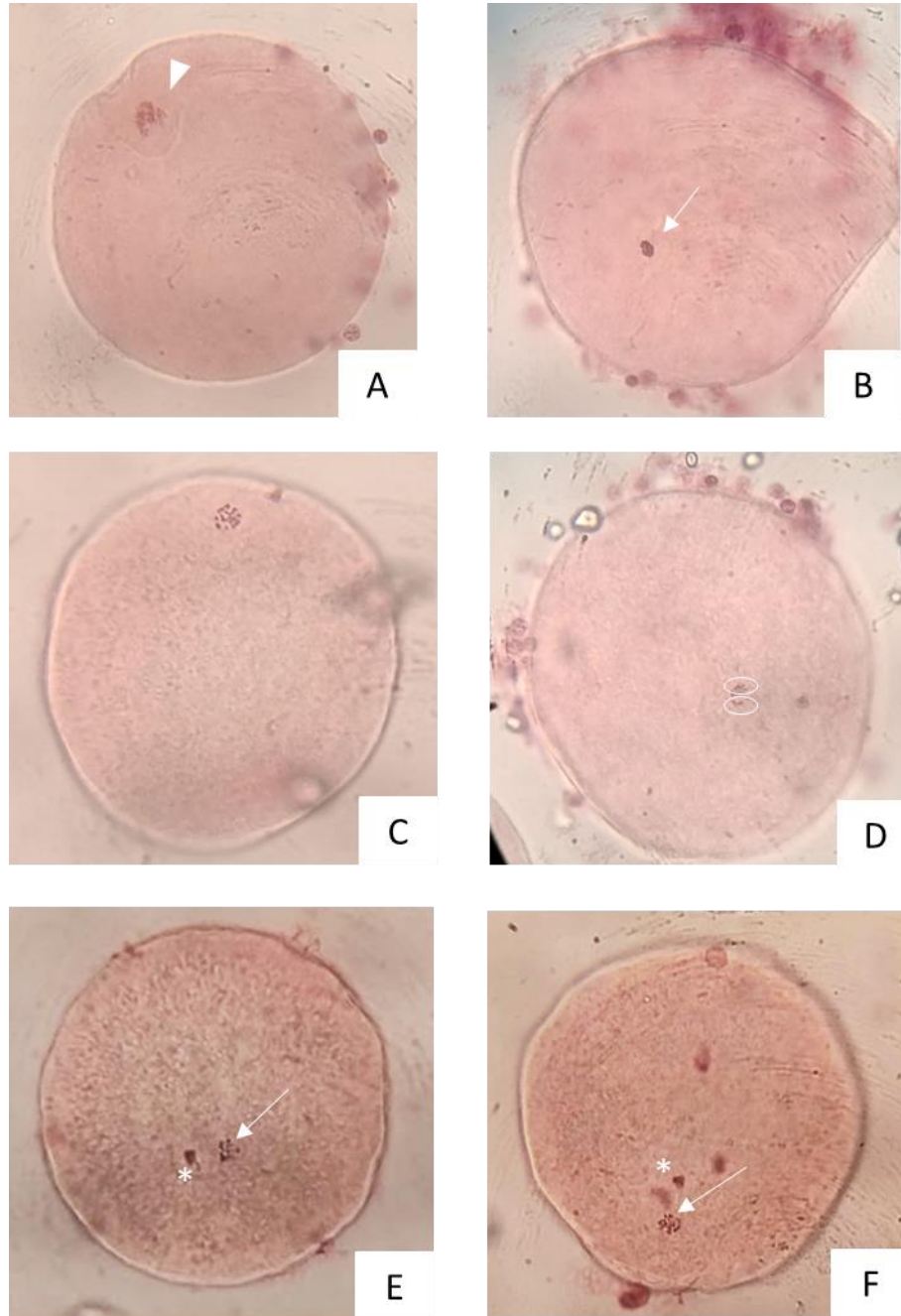


Figura 04: Avaliação do estágio de maturação nuclear de ovócitos bovinos corados por orceína acética. A: Vesícula germinativa (cabeça de seta); B: Material cromossômico condensado após rompimento da vesícula germinativa; C: Metáfase I; D: Anáfase/Telófase; E e F: Metáfase II (Seta - cromossomos; *- Corpúsculo polar).

4.3: PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Após 22 h de MIV, os COC foram lavados três vezes em meio Talp sp [Meio 199 suplementados com 0,006g/mL de albumina sérica bovina fração V (BSA) (A-9418), 10mM piruvato (P-4562) e 100 µg/mL de estreptomicina (S-1277), 100 UI/mL de penicilina (P-3032)] e uma vez em meio Talp-fec [Meio 199 suplementado com 6 mg/ml de BSA livre de ácidos graxos (A-8806), 100 UI/mL de penicilina (P-3032), 100 µg/mL de estreptomicina (S-1277), 2 mM de penicilamina (P-4875), 1 mM de hipotaurina (H-1384), 25 mM de epinefrina (E-4250) e 0,2mM de piruvato de sódio (P-4562)]. Após as lavagens os ovócitos (20/gota) foram transferidos para as gotas de 50µL de meio de Talp fec.

Em todo o experimento foram utilizadas palhetas de sêmen do mesmo touro, de uma mesma partida, que foram descongeladas em banho-maria à temperatura de 37°C, por 30 segundos. O sêmen foi depositado sobre o gradiente de Percoll® (GE Healthcare 17-0891-01) a 45% e 90%, em temperatura ambiente e centrifugado a 600 x g, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento espermático resultante foram adicionados 500 µL de Talp-sp, e novamente realizada outra centrifugação a 600 x g, por 5 minutos.

Os espermatozoides móveis obtidos após a segunda centrifugação foram então incubados com os ovócitos na gota de fertilização, em uma concentração de 2×10^6 /mL, em atmosfera úmida de 5% CO₂, a 38,5°C, por 18 horas.

O cultivo *in vitro* (CIV) dos possíveis zigotos foi realizado em meio SOF (BioKlone®), durante nove dias. As taxas de clivagem, produção de blastocistos, e eclosão foram avaliadas nos dias 3 (D3), 8 (D8) e 9 (D9) de desenvolvimento, respectivamente. O experimento foi realizado em quatro replicatas.

4.4: AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE ROMPIMENTO DA VESÍCULA GERMINATIVA (VG)

O experimento 3 foi desenvolvido na tentativa de elucidar se os resultados obtidos na PIV de embriões foram decorrentes do efeito do inibidor da Akt no tempo para rompimento da vesícula germinativa [do inglês, *germinal vesicle breakdown* (GVBD)]. Para isso, os COCs foram maturados *in vitro* por 3, 6 ou 9 horas em presença de 1µM do inibidor (G1) ou na

ausência deste (controle - GC). Após cada período de MIV, os ovócitos foram desnudados, fixados e corados utilizandoorceína acética 2%, tal como descrito acima, e observados em microscópio óptico (TE 300, NIKON). Os ovócitos foram classificados de acordo com a configuração cromossomal em: vesícula germinativa (VG), quando apresentavam seus cromossomos envoltos pela membrana nuclear íntegra (característica de ovócitos que não deram início à maturação nuclear, Figura 04 A) ou em VGBD, quando os oócitos já haviam sofrido o rompimento da vesícula germinativa e reiniciado a meiose. Neste último grupo (VGBD) foram incluídos os ovócitos que apresentavam a membrana nuclear segmentada (Figura 4 B) e os que se encontravam no estágio de anáfase/telófase e em metáfase I (Figura 04 C e D).

4.5: AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS GRÂNULOS CORTICAIS

Ovócitos maturados *in vitro* em presença das diferentes concentrações do inibidor foram desnudados e tratados com pronase (0,5%, P-5147) para remoção da zona pelúcida. Em seguida foram lavados três vezes em meio de lavagem e três vezes em solução de bloqueio [BSA fração V 0,1% (A-9418) e glicina 0,75% (G-5417), em PBS]. Os ovócitos foram então fixados em paraformaldeído (P-6148, 3%,) por 30 minutos, à temperatura ambiente, lavados três vezes em solução de bloqueio e permeabilizados em solução de 0,1 % de Triton X-100 (T-8572), em solução de bloqueio, estritamente por 5 minutos. Posteriormente os ovócitos foram lavados em solução de bloqueio e finalmente incubados com *Lens culinaris* aglutinina - FITC (0,0025%) (FL1041, Vector Lab), por 30 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz. Então, os ovócitos foram novamente lavados em solução de bloqueio e analisados sob microscopia de fluorescência. Os ovócitos foram classificados em duas categorias segundo a distribuição dos grânulos corticais: (i) grânulos em *cluster*, característica de ovócitos não maturados (Figura 05 A); (i) grânulos dispostos na periferia, característica de ovócitos maturados (Figura 05 B).

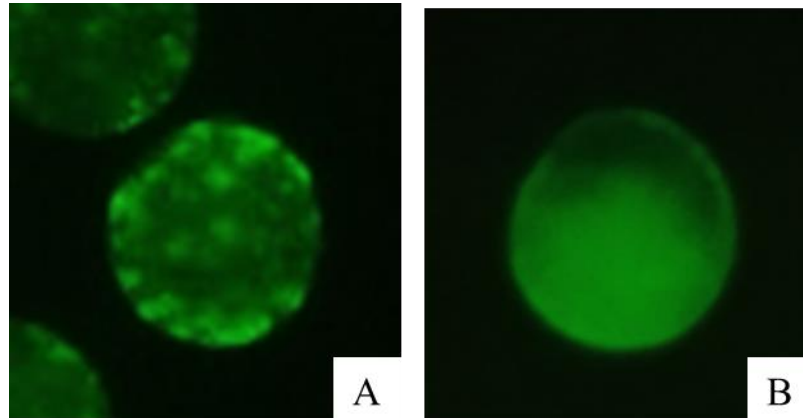


Figura 05: Marcação de grânulos corticais com *Lens culinaris* –FITC. 20X. A: Grânulos corticais em *clusters*, característica de ovócitos não maturados. B: Grânulos distribuídos na periferia, característica de ovócitos maturados.

4.6: QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO AMPc

A quantificação da concentração do AMPc foi realizada nos ovócitos e nas células do *cumulus* por meio de método de imunoenensaio enzimático utilizando o Cyclic AMP EIA Kit (Cayman Chemicals). O princípio do ensaio baseia-se na competição entre o AMPc proveniente das amostras e o AMPc conjugado à acetilcolinesterase (*AchE Tracer*) pelos sítios de ligação de anticorpos monoclonais de coelhos aderidos aos poços das placas. A concentração do AMPc conjugado com a acetilcolinesterase é constante, enquanto que a concentração de AMPc da amostra varia. Logo, a quantidade de AMPc ligado à acetilcolinesterase que é capaz de se ligar aos anticorpos da placa será inversamente proporcional à concentração de AMPc da amostra.

Para tal, 50 COCs tratados com 1 μM e 20 μM de triciribina, assim como aqueles do grupo controle, foram maturados *in vitro* (25 ovócitos/gota) por 3, 6 e 9 horas. Depois os COCs foram lavados em solução de álcool polivinílico 0,1% (PVA) (P-8136) em PBS livre de Ca^+ e então foram desnudados por meio de sucessivas pipetagens em uma placa de 4 poços (50 COCs/poço) contendo 150 μL de solução de hialuronidase (H-4272, 0,1%), em PBS livre de Ca^+ . Após o desnudamento os ovócitos foram lavados três vezes em meio 199 Hepes (M2520) suplementado com BSA 0,4% (A9647) e transferidos para um tubo de

microcentrífuga contendo 200 µL de solução de HCl 0,1M (Vetec), onde permaneceram por 20 minutos para lise. A cada 5 minutos os microtubos foram agitados no vortex. Em seguida os tubos foram centrifugados a 12.000 x g, por 5 minutos. O sobrenadante foi então transferido para novos tubos de microcentrífuga e armazenado a -20°C até a realização do teste.

As células do *cumulus* pertencentes a cada grupo resultante do desnudamento dos ovócitos e que ficaram retidas nos poços foram transferidas para tubos de microcentrífuga. No tubo foram adicionados 150 µL de meio 199 suplementado com BSA (0,4%) para inativação da hialuronidase e lavagem das células. Os tubos foram centrifugados a 600 x g por três minutos para a sedimentação das células. Posteriormente o sobrenadante foi retirado e ao tubo foram adicionados 200 µL de solução de HCl 0,1M (Vetec) para lise das células durante 20 minutos. A cada 5 minutos os microtubos foram agitados no vortex. Decorrido este tempo, os tubos foram centrifugados a 12.000 x g, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de microcentrífuga e armazenado a -20°C até a realização do teste. Foram feitas 3 repetições de cada tratamento.

Grupos de 50 COCs não maturados foram desnudados e os ovócitos e as células do *cumulus*, em separado, foram submetidos às mesmas condições de lise e estocagem descritas acima. Tal grupo foi chamado de grupo 0 (G0). Foram realizadas três repetições deste grupo.

O teste foi desenvolvido segundo as instruções do fabricante. Os tampões de Elisa, o tampão de lavagem, o cAMP AchE *tracer* e o AMPc EIA antisoro foram reconstituídos e estocados a 4°C até o momento da utilização. No dia da realização do teste as amostras foram descongeladas e foi realizada sua acetilação para melhor detecção do nucleotídeo cíclico. Para cada 80 µL de amostra, foram adicionados 16 µL de KOH (4 M) e 25 µL de anidrido acético (reagentes supridos pelo kit). A mistura foi homogeneizada em agitador tipo vortex, por 15 segundos estritamente e depois foram adicionados 25 µL de KOH 4 M. As amostras e a curva padrão foram distribuídas na placa de 96 poços. A placa foi coberta por filme plástico e permaneceu a 4°C, por 18 h, protegida da luz.

Após este tempo, os poços foram esvaziados, lavados e preenchidos com o reagente de Elmann, que contém substrato para a enzima acetilcolinesterase. A reação imunoenzimática entre a acetilcolinesterase conjugada ao anticorpo e o substrato emite coloração amarela que pode ser lida em um comprimento de onda entre 405 e 420 nm. A placa foi mantida por 120 minutos sob agitação e protegida da luz. O resultado da reação colorimétrica foi determinado

mediante leitura em espectrofotômetro (leitor de ELISA, Boitek[®], Winooski, EUA), a 420 nm.

4.9: ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise de variância (ANOVA) dos dados para testar o efeito da inibição sobre a maturação nuclear e citoplasmática, PIV, sobre o momento de rompimento de vesícula germinativa e sobre as concentrações de AMPc nos ovócitos e nas células do *cumulus*. As médias foram comparadas pelo teste SNK em nível de 5% de significância (SAS, 2009).

4.10: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho foi avaliado o efeito de diferentes concentrações da triciribina, um inibidor específico da Akt, sobre diferentes aspectos da maturação *in vitro* e seu impacto na produção *in vitro* de embriões.

Inicialmente, foi verificado o efeito de 1, 5, 10 e 20 μM de Triciribina sobre a maturação nuclear e citoplasmática, e a produção *in vitro* de embriões (Experimentos 1, 2 e 3). Foram realizadas 4 repetições de cada experimento. Devido aos resultados obtidos na PIV de embriões a concentração de 1 μM foi selecionada para verificar o efeito do inibidor na cinética de rompimento da vesícula germinativa. Foram realizadas três repetições. A menor e a maior concentração de Triciribina, 1 e 20 μM , respectivamente, foram selecionadas para mensuração das concentrações de AMPc nos ovócitos e nas células do *cumulus*. Foram realizadas três repetições de cada grupo (controle, 1 e 20 μM) nos tempos de 3, 6 e 9 horas de MIV (Experimento 5).

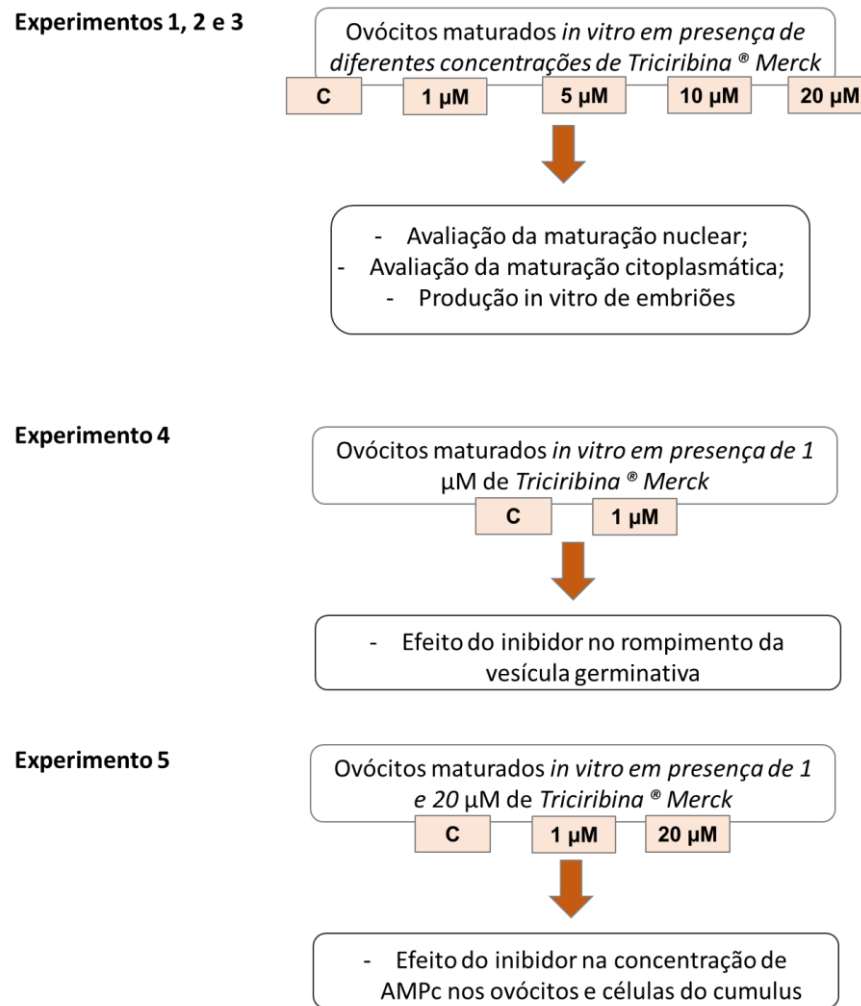


Figura 06: Desenho esquemático do delineamento experimental.

5. RESULTADOS

5.1: EFEITO DA INIBIÇÃO DA AKT NA MATURAÇÃO NUCLEAR

Quando os ovócitos foram tratados com 1 μM , 5 μM e 10 μM do inibidor da AKT não houve diferença significativa no número de ovócitos que atingiram o estágio de metáfase II, característica de maturação nuclear, quando comparada ao grupo (Tabela 01). Por outro lado, quando a maior concentração do inibidor (20 μM) foi utilizada, houve uma redução significativa do número de ovócitos em MII ($48,53 \pm 9,42$). Não houve diferença significativa no número de ovócitos que permaneceram no estágio de vesícula germinativa ou atingiram os estádios de anáfase/telófase. Porém, quando a maior concentração do inibidor (20 μM) foi utilizada houve um aumento no número de ovócitos em metáfase I ($24,35 \pm 3,74$), quando comparado ao grupo controle ($3,71 \pm 3,23$).

Tabela 01: Efeito de diferentes concentrações de triciribina na maturação nuclear de COCs bovinos.

Tratamento	(n)	Vesícula Germinativa	Metáfase I (% \pm DP)	Anáfase/Telófase (% \pm DP)	Metáfase II (% \pm DP)
Controle	75	$9,12 \pm 2,30^a$	$3,71 \pm 3,23^b$	$1,32 \pm 2,63^a$	$81,97 \pm 7,54^a$
1 μM	80	$9,64 \pm 15,96^a$	$11,07 \pm 11,05^{ab}$	$3,95 \pm 7,89^a$	$75,38 \pm 10,02^a$
5 μM	71	$14,88 \pm 25,22^a$	$15,14 \pm 11,23^{ab}$	0 ± 0^a	$69,86 \pm 15,34^{ab}$
10 μM	81	$9,29 \pm 9,91^a$	$29,10 \pm 15,17^{ab}$	$2,63 \pm 5,26^a$	$58,96 \pm 12,36^{ab}$
20 μM	75	$17,58 \pm 18,08^a$	$24,35 \pm 3,74^a$	$9,52 \pm 8,24^a$	$48,53 \pm 9,42^b$

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna pelo teste SNK, em 5% de probabilidade.

Curiosamente quando o tratamento de 20 μM foi utilizado durante a MIV, aqueles ovócitos que alcançavam o estágio de MII, comumente, apresentavam os cromossomos da placa metafásica condensados e de difícil visualização. Além disso foi observado o aparecimento de aberrações cromossômicas (Figura 7).

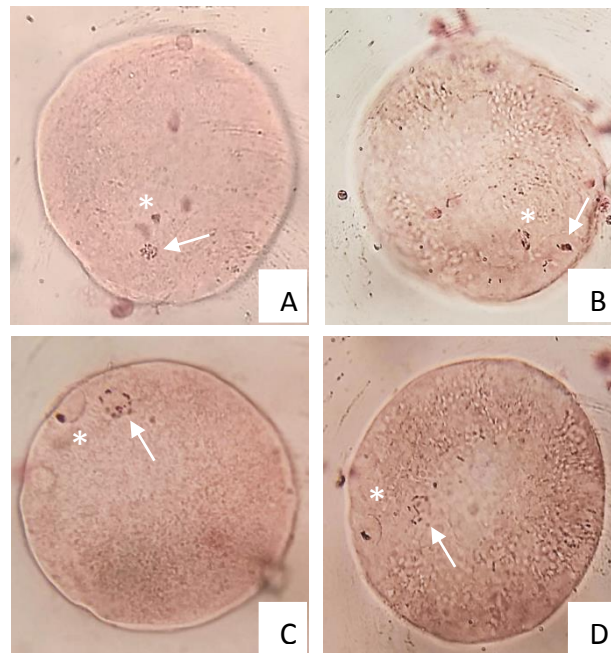


Figura 07: Ovócitos bovinos maturados *in vitro* por 22 horas corados por orceína acética. A: Grupo controle apresentando placa metafásica com cromossomos definidos e organizados; B: Grupo tratado com 20 μM de triciribina, apresentando placa metafásica com cromossomos condensados; C e D: Placa metafásica com aspecto aberrante. Seta - Placa metafásica; *- corpúsculo polar.

5.2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO INIBIDOR DA AKT NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A utilização da maior concentração do inibidor da Akt (20 μM) reduziu significativamente a taxa de clivagem quando comparada ao grupo controle (70,4 % \pm 7,7 % x

92,5 % \pm 3,0, respectivamente). Quando os ovócitos maturados *in vitro* em presença de 1 μ M de tricibina foram fertilizados *in vitro*, houve um aumento significativo da taxa de blastocistos, comparado ao grupo controle (47,1 % \pm 11,1 % x 27,3 % \pm 4,1 %). Quando as concentrações de 5 μ M e 10 μ M foram utilizadas, não houve diferença significativa entre os COCs desses grupos e aqueles do grupo controle na taxa de blastocistos (45,8 % \pm 5,7 % e 27,3 % \pm 4,1 %, respectivamente). COCs maturados na presença de 20 μ M de triciribina, no entanto, resultaram em uma taxa de blastocistos significativamente menor que aqueles do grupo controle (12,8 % \pm 6,2 % x 27,3 % \pm 4,1 %, respectivamente). Com relação à taxa de eclosão, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Tabela 02).

Tabela 02: Efeito da suplementação do meio de MIV com 0 (controle), 1, 5, 10, 20 μ M concentração de Triciribina na produção *in vitro* de embriões.

Tratamento	(n)	Taxa clivagem (% \pm DP)	Produção de blastocistos (% \pm DP)	Taxa de Eclosão (% \pm DP)
Controle	81	92,5 \pm 3,0 ^a	27,3 \pm 4,1 ^b	67,35 \pm 23,97 ^a
1 μ M	76	94,4 \pm 5,1 ^a	47,1 \pm 11,1 ^a	60,2 \pm 23,59 ^a
5 μ M	82	97,6 \pm 4,8 ^a	45,8 \pm 5,7 ^{ab}	59 \pm 20,33 ^a
10 μ M	80	93,7 \pm 4,8 ^a	30,12 \pm 8,32 ^b	65,6 \pm 19,94 ^a
20 μ M	70	70,4 \pm 7,7 ^b	12,84 \pm 6,17 ^c	33,33 \pm 33,33 ^a

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna pelo teste SNK em 5% de probabilidade.

5.3: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO INIBIDOR DA AKT NA CINÉTICA DE ROMPIMENTO DA VESÍCULA GERMINATIVA (VG)

Este experimento foi desenvolvido na tentativa de elucidar se os resultados de melhora na produção *in vitro* de embriões, utilizando a menor concentração do inibidor (1 μ M), eram

devido a um atrasado no rompimento da vesícula germinativa e consequente melhora na maturação *in vitro*. Porém, não houve diferença significativa no rompimento da vesícula

Tabela 03: Efeito de 1 μ M de triciribina na cinética de rompimento da vesícula germinativa.

	3 horas		6 horas		9 horas	
	VG (% \pm DP)	VGBD (% \pm DP)	VG (% \pm DP)	VGBD (% \pm DP)	VG (% \pm DP)	VGBD (% \pm DP)
Controle	84,4 \pm 7,2 ^a	15,60 \pm 7,2 ^a	55,59 \pm 27,4 ^a	44,41 \pm 7,4 ^a	3,70 \pm 6,4 ^a	96,30 \pm 6,4 ^a
1 μ M	83,35 \pm 8,4 ^a	16,65 \pm 8,4 ^a	40,55 \pm 19,8 ^a	57,49 \pm 16,4 ^a	2,77 \pm 4,7 ^a	97,23 \pm 4,8 ^a

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna, pelo teste SNK em 5% de probabilidade.

germinativa entre o grupo controle e o grupo tratado com 1 μ M às 3, 6 e 9 horas de MIV (Tabela 03).

5.4: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA TRICIRIBINA NA DISTRIBUIÇÃO DOS GRÂNULOS CORTICAIS

Não houve diferença significativa na distribuição dos grânulos corticais entre o grupo controle e o grupo tratado com 5 μ M do inibidor da Akt (80,7 % \pm 9,4 % x 63,6 % \pm 10,2 %, respectivamente). Quando as concentrações de 1 μ M e 10 μ M do inibidor foram utilizadas, houve uma redução significativa do número de ovócitos que apresentaram os grânulos corticais distribuídos periféricamente, que é um indicativo de ovócitos maturados, quando comparado ao grupo controle. Quando a concentração de 20 μ M foi utilizada durante a MIV houve uma redução ainda mais pronunciada no número de ovócitos que apresentaram grânulos com distribuição periférica ($P < 0,05$).

Tabela 04: Efeito triciribina na distribuição dos grânulos corticais.

Tratamento	(n)	Grânulos em <i>clusters</i> (% ± DP)	Grânulos periféricos (% ± DP)
Controle	73	23,3 ± 9,4 ^c	76,7 ± 9,4 ^a
1 µM	69	40,4 ± 6,3 ^b	60,4 ± 5,4 ^b
5 µM	68	34,3 ± 10,2 ^{bc}	65,7 ± 10,2 ^{ab}
10 µM	67	44,8 ± 7,9 ^b	55,2 ± 7,9 ^b
20 µM	72	59,2 ± 4,8 ^a	40,8 ± 4,8 ^c

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si na coluna pelo teste SNK em 5% de probabilidade.

5.5: QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO AMPc

Quando a concentração do AMPc foi determinada nos ovócitos mantidos no meio de MIV por 0, 3, 6 e 9 horas, não houve diferença significativa entre os tratamentos (1 e 20 µM) e o grupo controle (Tabela 5).

Tabela 05: Concentração do AMPc (pmol/ml) em ovócitos bovinos maturados *in vitro* por 0, 3, 6 e 9 horas em presença de diferentes concentrações de Triciribina.

	(n)	0 h	3 h (% ± DP)	6 h (% ± DP)	9 h (% ± DP)
Controle		0,88 ± 0,54 ^{Aa}	0,96 ± 0,39 ^{Aa}	1 ± 0,46 ^{Aa}	0,95 ± 0,23 ^{Aa}
1 µM		0,88 ± 0,54 ^{Aa}	0,83 ± 0,18 ^{Aa}	1,1 ± 0,03 ^{Aa}	0,58 ± 0,07 ^{Aa}
20 µM		0,88 ± 0,54 ^{Aa}	1,18 ± 0,83 ^{Aa}	0,67 ± 0,28 ^{Aa}	0,49 ± 0,18 ^{Aa}

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, maiúscula na

linha e minúscula na coluna. As análises foram realizadas pelo teste SNK em 5% de probabilidade.

Por outro lado, quando a concentração do AMPc foi mensurada nas células do *cumulus* houve um aumento significativo nos níveis de AMPc às 3 horas de maturação no grupo controle e no grupo tratado com 1 μ M quando comparado ao tempo 0. Quando a concentração de 20 μ M foi utilizada não houve diferença significativa entre os tempos analisados e a concentração manteve-se constante ($P < 0,05$). Às 3 horas de MIV o tratamento com 1 μ M de triciribina levou a um aumento significativo na concentração de AMPc quando comparado ao grupo controle ($P = 0,08$). Não houve diferença significativa na concentração de AMPc entre o controle e os tratamentos às 6 e 9 horas de maturação *in vitro* ($P < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6: Concentração de AMPc (pmol/ml) nas células do *cumulus* obtidas de ovócitos bovinos maturados *in vitro* por 0, 3, 6 e 9 horas em presença de diferentes concentrações de Triciribina.

	0 h (% \pm DP)	3 h (% \pm DP)	6 h (% \pm DP)	9 h (% \pm DP)
Controle	2,41 \pm 0,4 ^{Ba}	5,36 \pm 1,91 ^{Ab}	0,8 \pm 0,41 ^{Ba}	1,29 \pm 0,41 ^{Ba}
1 μ M	2,41 \pm 0,4 ^{Ba}	13,02 \pm 9,9 ^{Aa}	1,33 \pm 0,22 ^{Ba}	1,88 \pm 0,69 ^{Ba}
20 μ M	2,41 \pm 0,4 ^{Aa}	1,85 \pm 1,34 ^{Ab}	1,31 \pm 0,80 ^{Aa}	1,71 \pm 0,85 ^{Aa}

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste SNK. Maiúsculas na linha ($P < 0,05$) e minúsculas na coluna ($P = 0,08$).

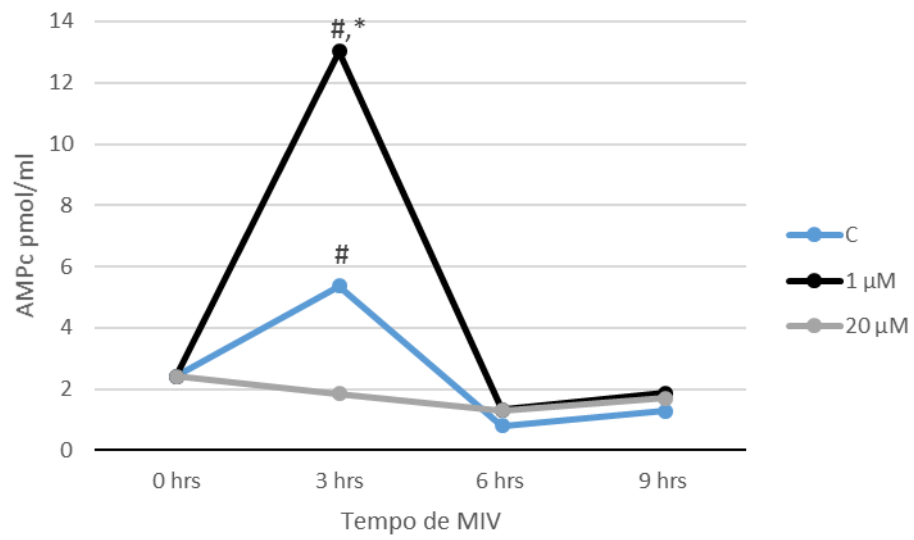


Figura 10: Efeito da 1 20 triciribina, na concentração de AMPc (pmol/ml) de células do *cumulus*. * Diferença entre os tratamentos às 3 horas de MIV ($P < 0,05$) # diferença entre o tempo 0 e 3 horas ($P=0,08$).

6. DISCUSSÃO

Apesar da enzima Akt estar envolvida em importantes processos biológicos, pouco se sabe sobre sua participação durante a maturação *in vitro* de ovócitos de mamíferos. Assim, o presente estudo buscou entender o efeito da regulação de sua atividade sob diferentes aspectos da maturação *in vitro* de ovócitos bovinos e seu impacto no desenvolvimento embrionário inicial.

A maturação dos COCs na presença de 1, 5 e 10 μM de triciribina não influenciou o percentual de ovócitos em metáfase II. Por outro lado, quando a triciribina foi usada na concentração de 20 μM , o percentual de ovócitos que progrediram até o estágio de metáfase II foi reduzido e houve um aumento significativo no percentual de ovócitos em que a maturação nuclear foi interrompida no estágio de metáfase I. Tomek e Smiljakovic (2005) também relataram um aumento de ovócitos no estágio de metáfase I quando 50 μM de SH6, um inibidor da Akt, foi utilizado durante 22 horas da MIV. Entretanto, quando os ovócitos foram cultivados por mais de 10 horas sem a presença do inibidor, o percentual de ovócitos em MII não diferiu do grupo controle, demonstrando assim que a Akt participa da progressão da metáfase I para metáfase II.

A triciribina é um potente inibidor seletivo das três isoformas da Akt e o seu uso para o tratamento de neoplasias tem sido estudado devido à participação da enzima no controle da proliferação e sobrevivência celular. Em humanos, concentrações de 50 a 75 μM reduziram significativamente o crescimento do insulinooma e do tumor de células endócrinas do intestino (GLOESENKAMP *et al.*, 2012). No nosso estudo, foram avaliadas concentrações inferiores às utilizadas para o tratamento de neoplasias visando obter um efeito de modulação da via PI3K/Akt e não inibição completa.

Os eventos nucleares da meiose são dependentes de uma organizada e bem controlada dinâmica de microtúbulos e microfilamentos, que devem trabalhar de forma conjunta para que ocorra a correta segregação dos cromossomos, preparando o ovócito para a fertilização. Em camundongos, a Akt participa da correta disposição dos microtúbulos e dos cromossomos durante a MIV (HOSHINO *et al.*, 2004). O uso de anticorpos específicos para pAkt-Ser473 durante a MIV comprometeu a extrusão do segundo corpúsculo polar e quando anti-pAktThr308 foi utilizado, a distribuição dos microtúbulos foi afetada e os cromossomos

apresentaram alinhamento aberrante (HOSHINO e SATO 2008). Em nosso trabalho, o uso de 20 μM de triciribina resultou no aparecimento de configurações cromossômicas aberrantes (Figura 07) similares às relatadas por HOSHINO e SATO (2008). Tomados em conjunto, os achados já reportados e os dados obtidos em nosso experimento confirmam a importância da Akt durante a progressão da maturação nuclear de ovócitos bovinos e este efeito parece ser devido a participação da enzima no controle de microtúbulos e microfilamentos e a correta segregação dos cromossomos durante a MIV, porém mais estudos são necessários para investigar esta hipótese.

Quando os COCs maturados em presença de 20 μM de triciribina foram fertilizados *in vitro*, o desenvolvimento embrionário inicial também foi comprometido e houve uma redução significativa na taxa de clivagem e de produção de blastocistos. Por outro lado, quando a menor concentração do inibidor foi utilizada durante a MIV, houve um aumento do número de embriões produzidos *in vitro*. Estes resultados confirmam o efeito dose dependente do inibidor, porém ainda não está claro como a modulação da Akt durante a MIV pode aumentar a produção *in vitro* de embriões. Em *Xenopus*, a Akt regula a PDE, enzima que participa do controle dos níveis de AMPc intraovocitários. É possível que a modulação da atividade da Akt, promova uma redução da atividade da PDE, levando a uma queda menos abrupta da concentração de AMPc nos ovócitos durante a retomada e progressão da meiose. Isto pode ter cooperado para uma melhora na dinâmica de maturação citoplasmática e nuclear, contribuindo para uma melhor capacitação ovocitária para a fertilização e o desenvolvimento embrionário. Como a Akt está envolvida em muitos processos celulares como metabolismo energético, sobrevivência celular, síntese proteica, dentre outras, é possível que a modulação de sua atividade possa influenciar a maturação ovocitária e o desenvolvimento embrionário inicial por outros mecanismos além dos analisados neste trabalho.

Com o objetivo de investigar a participação da Akt na retomada da meiose, COCs submetidos a 1 μM de triciribina (concentração que resultou na maior taxa de blastocistos) foram analisados após 3, 6 e 9 horas da MIV. Nos tempos analisados, o inibidor não foi capaz de alterar significativamente o momento de rompimento da vesícula germinativa. Anas *et al.* (2000) também não encontraram diferença significativa no momento do rompimento da vesícula germinativa em presença de um inibidor da PI3K, o wortmannin. Considerando que a inibição da Akt não altera a quebra da vesícula germinativa, mas que sua forma fosforilada (ativa) estimula a atividade da PDE (ANDERSEN *et al.*, 1998), pode-se sugerir que a via

PI3K/Akt participa do processo, mas outros fatores podem estar envolvidos (SHIMADA *et al.*, 2013).

No nosso estudo, a distribuição dos grânulos corticais foi utilizada como um marcador da maturação citoplasmática. Estas organelas são formadas a partir do complexo de Golgi e em ovócitos imaturos encontram-se distribuídos no citoplasma, formando aglomerados (clusters), mas após a maturação atingem uma posição justaposta à membrana plasmática para desempenhar sua função de bloqueio à poliespermia. O tratamento dos COCs com 1 ou 10 μM de triciribina reduziu o percentual de ovócitos que apresentaram distribuição periférica dos grânulos corticais, comparado ao controle, porém esse efeito foi mais intenso nos COCs tratados com 20 μM de triciribina. Esse resultado demonstra a participação da Akt na migração dos grânulos corticais, o que pode ser um indicativo da participação da via PI3/Akt na maturação citoplasmática de ovócitos bovinos.

A participação da Akt na reorganização dos filamentos de actina, estruturas responsáveis pelo tráfego dessas organelas ao longo do ooplasma, já foi demonstrada em outros tipos celulares como células tronco mesenquimais (MULLER *et al.*, 2013), fibroblastos embrionários de frango (QIAN *et al.*, 2004), dentre outros, mas são necessários mais estudos com objetivo de comprovar esta hipótese em ovócitos de bovinos. De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que demonstra a participação da Akt na distribuição dos grânulos corticais durante a maturação de ovócitos mamíferos. Curiosamente a suplementação do meio de MIV com 1 μM de triciribina, apesar de levar a uma redução do percentual de ovócitos que apresentavam grânulos corticais periféricos, aumentou a taxa de blastocistos. É possível que o inibidor retarde a maturação citoplasmática e que mais tempo seja necessário para que haja migração completa dos grânulos corticais para a periferia dos ovócitos.

Recentemente um estudo desenvolvido por nosso grupo demonstrou que o uso da triciribina durante a maturação reduziu a porcentagem de ovócitos que apresentavam mitocôndrias com distribuição periférica, característica de ovócitos imaturos, e aumentou o número de ovócitos com mitocôndrias apresentando distribuição intermediária (transição) entre a periferia e o centro do ooplasma, característica de ovócitos que deram início à maturação citoplasmática. Apesar disso, cerca de 30-40% dos ovócitos, independentemente da concentração de triciribina a que foram expostos durante a MIV, permaneceram com as mitocôndrias periféricas, característica de ovócitos imaturos (RIBEIRO, 2017), percentual

semelhante ao observado com a distribuição dos grânulos corticais no presente trabalho. Tomados em conjunto estes dados sugerem que apesar do aumento no número de blastocistos produzidos *in vitro*, existe uma porcentagem de ovócitos irresponsivos ao tratamento, e que mantêm parte de suas organelas distribuídas como observado em ovócitos imaturos. Este efeito deve estar associado à capacidade intrínseca do ovócito de sofrer a maturação citoplasmática, que sofre influência do estágio de crescimento que o ovócito se encontra no momento da aspiração folicular, uma vez que ovócitos provenientes de folículos de menor tamanho apresentam menor capacidade para o desenvolvimento embrionário inicial (STROEBECH *et al.*, 2015).

Com o objetivo de verificar a participação da /Akt na concentração de AMPc durante a retomada da meiose, COCs e células do *cumulus* tratados com 1 e 20 μ M de triciribina durante a MIV foram utilizados. A concentração de AMPc intraovocitária não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais, assim como entre os tempos observados.

Em camundongos e *Xenopus* a redução dos níveis intraovocitários de AMPc tem sido considerado um pré-requisito para a retomada na maturação ovocitária (SCHIMIDT e NEBREDA, 2002; LI *et al.*, 2012). Em bovinos, os poucos estudos na área têm apresentado resultados diversos, visto que utilizam tempos de maturação, tipo de estruturas analisadas (ovócitos desnudos, COCs ou células do *cumulus*), metodologia e meios de cultivo, por vezes diferentes. De forma semelhante aos nossos achados, Aktas *et al.* (1995) também não encontraram diferenças nos níveis de AMPc entre os tempos de MIV analisados (0, 15, 60 e 125 minutos), e sugeriram que esse resultado pode ter sido decorrente da grande quantidade de ovócitos requeridos para a análise, obtidos de diferentes animais e populações foliculares diversas, o que resulta em uma grande variabilidade amostral. Diferentemente, Ezoë *et al.* (2015) reportaram que a concentração intraovocitária de AMPc apresentou uma redução com 1 hora e 4 horas da MIV.

Por outro lado, nas células do *cumulus*, os níveis de AMPc do grupo controle e daqueles tratados com 1 μ M de triciribirina aumentaram significativamente às três horas da MIV, comparado ao tempo inicial (0 hora) ($P < 0,05$). Li *et al.* (2012) também reportaram esse aumento das concentrações de AMPc em células do *cumulus* de camundongos nas primeiras horas de MIV. Este resultado pode ser atribuído à presença do FSH no meio de MIV, pois esta gonadotrofina ativa receptores ligados à proteína G (GPR3 e GPR12)

(MEHLMANN, 2005), presentes na membrana plasmática, o que leva a ativação da enzima adenilato ciclase, promovendo um aumento na produção de AMPc (LUCIANO *et al.*, 2004).

No presente estudo as concentrações de AMPc nos ovócitos mantiveram-se constantes às 3, 6 e 9 horas de MIV enquanto nas células do *cumulus* esse nucleotídeo apresentou um pico às 3 horas. Considerando que enzima adenilato ciclase (AC) já foi identificada no ooplasma de ovócitos bovinos (KUYT *et al.*, 1988) e o uso do forskolin, um ativador dessa enzima, reduziu momentaneamente a retomada da maturação (HOMA, 1988), é possível concluir que parte do AMPc responsável pela manutenção da parada meiótica é produzida pelo próprio ovócito. Mas, em bovinos as células do *cumulus* parecem ter papel determinante no controle da parada/retomada da maturação. Segundo Thomas *et al.* (2004), o tratamento de COCs bovinos com forskolin levou a um aumento de 20 a 90 vezes a concentração do AMPc intraovocitário. Por outro lado, quando o forskolin foi utilizado em ovócitos desnudos, esse aumento foi de 2 a 6 vezes (Thomas *et al.*, 2004). Corroborando com esses achados, Richard e Sirard (1996) relataram que quando COCs foram co-cultivados com células da teca por 12 horas, cerca de 60% permaneceram no estágio de vesícula germinativa, mas quando ovócitos desnudos foram co-cultivados nessas mesmas condições, somente 3% mantiveram a parada meiótica. Nossos resultados também demonstram um papel preponderante das células do *cumulus* na produção do AMPc e possivelmente no controle da retomada da meiose.

Em nossos estudos, o aumento da concentração de AMPc nas células do *cumulus*, detectado às 3 horas da MIV, não se refletiu em um aumento do AMPc intraovocitário. Horner *et al.* (2003) descreveram resultados semelhantes em camundongos. Segundo esses autores, o equilíbrio entre a síntese e a degradação do AMPc em ovócitos ocorre de forma diferente do que em células somáticas. Além disso, às 3 horas da MIV, parte da comunicação entre ovócitos e células do *cumulus* apresenta cerca de 50% de interrupção (THOMAS *et al.*, 2003), o que reduz drasticamente a oferta de AMPc e GMPc para o ovócito. É possível que o AMPc ofertado pelas células do *cumulus* via junções comunicantes possa ser logo degradado pela PDE3A que está ativada no ovócito devido à redução da oferta de GMPc.

A comparação dos níveis de AMPc entre os diferentes grupos experimentais às três horas da MIV mostrou que o tratamento dos COCs com 1 μ M de triciribina induziu um aumento significativo ($P = 0,08$) da concentração de AMPc nas células do *cumulus* em relação ao controle, possivelmente pela participação da via no controle da atividade da PDE e desta nas concentrações de AMPc durante a retomada da maturação.

Muitos agentes capazes de elevar os níveis de AMPc têm sido estudados durante a MIV e comumente o uso desses moduladores leva a uma melhora nos índices de PIVe de forma similar ao que foi encontrado neste trabalho. THOMAS *et al.* (2004) demonstraram um atraso na maturação nuclear quando a MIV foi realizada na presença de inibidores de PDE, mas o aumento de quase 30 % na produção de embriões ocorreu quando a fertilização foi realizada após 28 de MIV.

Luciano *et al.* (1999) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de adenilato ciclase invasiva (iAC), uma toxina produzida pela *Bordetella pertussis*, na maturação nuclear e PIVe. Baixas concentrações de iAC durante a coleta e/ou maturação aumentaram a produção de embriões, indicando que uma concentração ideal de AMPc deve ser mantida antes e durante as horas iniciais de MIV para que haja uma maior competência para o desenvolvimento embrionário inicial. No presente estudo, a modulação nos níveis de AMPc, proporcionada pelo tratamento dos COCs com 1 μ M de triciribina, pode ter contribuído para garantir níveis adequados de AMPc intraovocitários, resultando em aumento na produção de blastocistos.

7. CONCLUSÃO

A suplementação do meio de maturação *in vitro* com triciribina, um inibidor seletivo da Akt, afeta a maturação nuclear sem, no entanto, comprometer a retomada da meiose e também afeta a distribuição dos grânulos corticais. O tratamento dos COCs com 1 μ M de tricirina promove um aumento na taxa de produção de blastocistos, assim como um aumento na concentração de AMPc nas células do *cumulus*, sem alterar a concentração intraovocitária deste nucleotídeo. Esse resultado demonstra a possibilidade de incremento na produção de embriões bovinos por meio do uso do inibidor da Akt, porém a relação entre o papel da via da PI3K/Akt nas células do *cumulus* e seu impacto na maturação *in vitro* precisa ser melhor investigado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, v.281, p.1322–1326, 1998.

ADONAAB, P. R.; MONZANIAB, P. S.; GUEMRAAB, S.; MIRANDAC, M. S.; OHASHIC, O. M. Oogenesis and Folliculogenesis in Mammals. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v.15(3), p.245-50, 2013.

AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. **Reproduction in domestic animals**, v.45(1), p.180-187, 2010.

ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v.25(12), p.2999-3011, 2010.

ANAS, M. I.; SHIMADA, M.; TERADA, T. Possible role for phosphatidylinositol 3-kinase in regulating meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v.50(3), p.347-356, 1998.

ANAS, M. K. I.; SHIMADA, M.; TERADA, T. Possible role for phosphatidylinositol 3-kinase in regulation meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v.50, p.347-356, 1997.

ANAS, M. K. I.; SHOJO, A.; SHIMADA, M.; TERADA, T. Effects of wortmannin on the kinetics of GVBD and the activities of the maturation promoting factor and mitogen-activated protein kinase during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Theriogenology**, v.53, p.1797-1806, 2000.

ANDERSEN, C. B.; ROTH, R. A.; CONTI, M. Protein kinase B/Akt induces resumption meiosis in *Xenopus* oocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.18705-18708, 1998.

ANDRADE, G. M.; DA SILVEIRA, J. C.; PERRINI, C.; DEL COLLADO, M.; GEBREMEDHN, S.; TESFAYE, D.; MEIRELLES F.V.; PERECIN, F. The role of the PI3K-Akt signaling pathway in the developmental competence of bovine oocytes. **PLoS one**, v.12(9), e0185045, 2017.

ATKAS, H, WHEELER M. B.; FIRST, N.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGEM, M. L. Maintenance of meiotic arrest by increasing [cAMP]_i may have physiological relevance in bovine oocytes. **J Reprod Fertil**, v.105, p.237–245, 1995.

BARRETTO, L. S. S.; CASTRO, V. C.; GARCIA, J. M.; MINGOTI, G. Z. Role of roscovitine and IBMX on kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Animal reproduction science**, v.99(1-2), p.202-207, 2007.

BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine Oocyte Meiotic Inhibition Before *In vitro* Maturation and Its Value to *In vitro* Embryo Production: Does it Improve Developmental Competence? **Reproduction in domestic Animal**, v.47(4), p.687-93, 2012.

BORNSLAEGER, E. A.; SCHULTZ, R. M. Regulation of mouse oocyte maturation: Effect of elevating *cumulus* cell cAMP on oocyte cAMP levels. **Biology of reproduction**, v.33(3), p.698-704, 1985.

BRUNET, S.; MARO, B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: Integrating time and space. **Reproduction**, v.130(6), p.801-811, 2005.

CARDONE, M. H.; ROY, N.; STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S.; FRANKE, T. F.; STANBRIDGE, E.; FRISCH, S.; REED, J. C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science**, v.282, p.1318–1321, 1998.

CARNERO, A.; LACAL, J. C. Wortmannin, an inhibitor of phosphatidyl-inositol 3-kinase, induces oocyte maturation through a MPF-MAPK-dependent pathway. **FEBS letters**, v.422(2), p.155-159, 1998.

CECCONI, S.; MAURO, A.; CELLINI, V.; PATACCHIOLA, F. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. **The International Journal of Developmental Biology**, v.56, p.809-817, 2012.

COHEN, P.; FRAME, S. The renaissance of GSK3. Nature Reviews. **Molecular Cell Biology**, v.2, p.769–776, 2001.

CONTI, M.; HSIEH, M.; ZAMAH, A. M.; OH, J. S. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Molecular and cellular endocrinology**, v.356 (1-2), p.65-73, 2012.

DATTA, S. R.; DUDEK, H.; TAO, X.; MASTERS, S.; FU, H.; GOTOH, Y.; GREENBERG, M. E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell**, v.91, p.231–241, 1997.

DE LOOS, F., VAN VLIET, C., VAN MAURIK, P. & KRUIP, T. A. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Res** 24, 197–204, 1989.

DE SOUZA, D. K.; SALLES, L. P.; CAMARGO, R., GULART, L. V. M.; E SILVA, S. C.; DE LIMA, B. D.; TORRES, F. A. G.; ROSA E SILVA, A. A. M. Effects of PI3K and FSH on steroidogenesis, viability and embryo development of the *cumulus*–oocyte complex after *in vitro* culture. **Zygote**, v.26(1), p.50-61, 2018.

DIENSTMANN, R.; RODON, J.; SERRA, V.; TABERNERO, J. Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. **Molecular cancer therapeutics**, v.13(5), p.1021-1031, 2014.

DOWNWARD, J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. **Current opinion in cell biology**, v.10(2), p.262-267, 1998.

DUBEIBE, D. F.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C.; MACIEL, V. L. JR.; SAMPAIO, W. V.; QUIRINO, C. R.; GONÇALVES, P. B.; DE CESARO, M. P.; FAES, M. R.; PAES DE CARVALHO, C. S. L-arginine affects the IVM of cattle *cumulus*-oocyte complexes. **Theriogenology**, v.88, p.134-144, 2017.

DUNNING K. R.; RUSSEL, D. L.; ROBKER, R. L. Lipids and oocyte 953 developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. **Reproduction**, v.148(1), p.15-27, 2014.

DUPRÉ, A.; HACCARD, O.; JESSUS, C. Mos in the oocyte: How to use MAPK independently of growth factors and transcription to control meiotic divisions. **Journal of signal transduction**, v. 2011, p. 1-15, 2010.

EZOE, K.; YABUUCHI, A.; TANI, T.; MORI, C.; MIKI, T.; TAKAYAMA, Y.; BEYHAN, Z; KATO, K. Developmental competence of vitrified-warmed bovine oocytes at the germinal-vesicle stage is improved by cyclic adenosine monophosphate modulators during *in vitro* maturation. **PloS one**, 10(5), e0126801, 2015.

FABI, F.; ASSELIN, E. Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus. **Reproduction**, v.148(5), p.85-95, 2014.

FAN, H. Y.; SUN, Q. Y. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biology of reproduction**, v.70, p.535-547, 2004.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p.836-848, 2009.

FRANCIS, S. H.; BLOUNT, M. A.; CORBIN, J. D. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiological reviews*, v.91(2), p.651-690, 2011.

FRUMAN, D.A.; ROMMEL, C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.13(2), p.140-56, 2014.

GARDNER, A. M.; VAILLANCOURT, R. R.; LANGE-CARTER, C. A.; JOHNSON, G. L. MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. **Molecular Biology of the Cell**, v.5(2), p.193-201, 1994.

GEBAUER, F.; RICHTER, J. D. Synthesis and function of Mos: The control switch of vertebrate oocyte meiosis. **Bioessays**, v.19, p.23-28, 1997.

GHARBI, S. I.; ZVELEBIL, M. J.; SHUTTLEWORTH, S. J.; HANCOX, T.; SAGHIR, N.; TIMMS, J. F.; WATERFIELD, M. D. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. **Biochemical Journal**, v.404(1), p.15-21, 2007.

GILCHRIST, R. B.; LUCIANO, A. M.; RICHANI, D.; ZENG, H. T.; WANG, X.; DE VOS, M.; SUGIMURA, S.; SMITZ, J.; RICHARD, F. J.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction**, v.152, p.143-157, 2016.

GILCHRIST, R. B.; ZENG, H. T.; WANG, X.; RICHANI, D.; SMITZ, J.; THOMPSON, J. G. Reevaluation and evolution of the simulated physiological oocyte maturation system. **Theriogenology**, v.84(4), p. 656-7.

GLOESENKAMP, C. R.; NITZSCHE, B.; OCKER, M. DI FAZIO, P.; QUINT, K.; HOFFMANN, B.; SCHERÜBL, H; HÖPFNER, M. AKT inhibition by triciribine alone or as combination therapy for growth control of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. **International Journal of Oncology**, v.40, p.876-888, 2012.

GOMES, H. Influência da via de sinalização por insulina na maturação e desenvolvimento embrionário 24 inicial em bovinos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), 2010.

GOTO, M.; IWASE, A.; ANDO, H.; KUROTSUCHI, S.; HARATA, T.; KIKKAWA, F. PTEN and Akt expression during growth of human ovarian follicles. **J Assis Reprod Genet**, v.24, p.541-546, 2007.

HOMA, S.T. Effects of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of *cumulus*-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium. **J Exp Zool** 248:222–231.

HORNER, K.; LIVERA, G.; HINCKLEY, M.; TRINH, K.; STORM, D.; CONTI M. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. **Developmental Biology**, v.258, p.385–396, 2003

HOSHINO, Y.; SATO, E. Protein kinase B (PKB/Akt) is required for the completion of meiosis in mouse oocytes. **Developmental Biology**, v.314(1), p.215-223, 2008.

HOSHINO, Y.; YOKOO, M.; YOSHIDA, N.; SASADA, H.; MATSUMOTO, H.; SATO, E. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt participate in the FSH-induced meiotic maturation of mouse oocytes. **Molecular reproduction and development**, v.69(1), p.77-86, 2004.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16(2), p.78-80, 1994.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

HYTTEL, P.; VIUFF, D.; FAIR, T.; LAURINCIK, J.; THOMSEN P. D.; CALLESEN, H. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, v.122, p.21–30, 2001.

HYTTEL, P.; XU, K. P.; SMITH, S.; GREVE, T. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. **Journal of reproduction and fertility**, v.78(2), p.615-625, 1986.

JEAN, S.; KIGER, A. A. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. **Journal of Cell Science**, v.127(5), p.923–928, 2014.

JENSEN, J. T.; SCHWINOF, K. M.; ZELINSKI-WOOTEN, M. B.; CONTI, M.; DEPAOLO, L. V.; STOUFFER, R. L. Phosphodiesterase 3 inhibitors selectively block the spontaneous resumption of meiosis by macaque oocytes *in vitro*. **Human Reproduction**, v.17(8), p.2079-2084, 2002.

JOAN, K.; RILEYA; MARY, O.; CARAYANNOPOULOSA, C.; AMANDA, H.; WYMANA; MAGGIE, C.; CHRISTINE, K.; RATAJCZAKA; KELLE, H.; MOLEYA, B. T. The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo. **Developmental Biology**, v.284, p.377 – 386, 2005.

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. **Developmental biology**, v.321(1), p.197-204, 2008.

KALOUS, J.; KUBELKA, M.; SOLC, P.; SUSOR, A.; MOTLIK, J. AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. **Reproduction**, v.138(4), p.645-654, 2009.

KALOUS, J.; SOLC, P.; BARAN, V.; KUBELKA, M.; SCHULTZ, R. M.; MOTLIK, J. PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes. **Biology of the Cell**, v.98(2), p.111-123, 2006.

KANG, M. K. Invited Mini Review: Post-transcriptional and post-translational regulation during mouse oocyte maturation. **BMB reports**, v.44(3), p.147-157, 2011.

KIM, N.H.; CHO, S. K.; CHOI, S. H.; KIM, E.Y.; PARK, S. P.; LIM J. H. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Zygote**, v.8(1), p.25-32, 2000.

KOVO, M.; KANDLI-COHEN, M.; BEN-HAIM, M.; GALIANI, D.; CARR, D. W.; DEKEL, N. An active protein kinase A (PKA) is involved in meiotic arrest of rat growing oocytes. **Reproduction**, v.132(1), p.33-43, 2006.

KUYT, J.R.M.; KRUIP, A.M.; DE JONG-BRINK, M. Cytochemicalm localization of adenylate cyclase in bovine *cumulus*-oocyte complexes. **Exp Cell Res**, v.174, p.139-145, 1988.

LEBEDEVA, I.; SINGINA, G.; LOPUKHOV, A.; SHEDOVA, E.; ZINOVIEVA N. Intracellular 38 pathways mediating direct effects of prolactin and growth hormone on bovine metaphase-ii 39 oocytes aging *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development** v.27, p.231-231.

LI, J.; MAO, G.; XIA, G. FSH modulates PKAI and GPR3 activities in mouse oocyte of COC in a gap junctional communication (GJC)-dependent manner to initiate meiotic resumption. **PLoS One**, v.7(9), e37835, 2012.

LIETZKE, S. E.; BOSE, S.; CRONIN, T.; KLARLUND, J.; CHAWLA, A.; CZECH, M.P. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. **Molecular Cell**, v.6, p.385-94. 2000.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p.355–365, 1997.

LÓPEZ-CARDONA, A. P.; SÁNCHEZ-CALABUIG, M. J.; BELTRAN-BREÑA, P.; AGIRREGOITIA, N.; RIZOS, D.; AGIRREGOITIA, E.; GUTIERREZ-ADÁN, A. Exocannabinoids effect on *in vitro* bovine oocyte maturation via activation of AKT and ERK1/2. **Reproduction**, v.152(6), p.603-612, 2016.

LUCIANO, A. M.; MODINA, S; VASSENA, R.; MILANESI, E.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. Role of intracellular cyclic adenosine 30,50-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Biol Reprod** v.70, p.465–472, 2004.

LUCIANO, A.M.; POCAR P, MILANESI E, MODINA S, RIEGER D, LAURIA A, GANDOLFI F. Effect of different levels of intracellular cAMP on the *in vitro* maturation of cattle oocytes and their subsequent development following *in vitro* fertilization. **Mol Reprod Dev** v.54, p.86–91, 1999.

MCGAUGHEY, R. W.; RACOWSKY, C.; RIDER, V.; BALDWIN, K.; DEMARAIS, A. A.; WEBSTER, S. D. Ultrastructural correlates of meiotic maturation in mammalian oocytes. **J Electron Microsc Tech**, v.16(4), p.257-80, 1990.

MEHLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v.130(6), p.791-799, 2005.

MEHLMANN, L. M.; JONES, T. L.; JAFFE, L. A. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. **Science**, v.297(5585), p.1343-1345, 2002.

MEHLMANN, L. M.; SAEKI, Y.; TANAKA, S.; BRENNAN, T. J.; EVSIKOV, A. V.; PENDOLA, F. L.; EPPIG, J. J.; JAFFE, L. A. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. **Science**, v.306(5703), p.1947-1950, 2004.

MO, X.; WU, G.; YUAN, D.; JIA, B.; LIU, C.; ZHU, S.; HOU, Y. Leukemia inhibitory factor enhances bovine oocyte maturation and early embryo development. **Molecular reproduction and development**, v.81(7), p.608-618, 2014.

MORENO, R. D.; SCHATTEEN, G.; RAMALHO-SANTOS, J. Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte *in vitro* maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1259–66, 2002.

MÜLLER, P.; LANGENBACH, A.; KAMINSKI, A.; RYCHLY, J. Modulating the actin cytoskeleton affects mechanically induced signal transduction and differentiation in mesenchymal stem cells. **PloS one**, v.8(7), e71283, 2013.

NORRIS, R. P.; RATZAN, W. J.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L. M.; KRALL, J.; MOVSESIAN, M. A.; WANG, H.; KE, H.; NIKOLAEV, V.O.; JAFFE, L. A. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v.136(11), p.1869-1878, 2009.

OKUMURA, E.; FUKUHARA, T.; YOSHIDA, H.; HANADA, S. I.; KOZUTSUMI, R.; MORI, M.; TACHIBANA, K.; KISHIMOTO, T. Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. **Nature cell biology**, v.4(2), p.111, 2002.

OLIVEIRA, E. G.; POLISSENI, J.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na ovogênese. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v.1, p.29–33, 2009.

OZES, O. N.; MAYO, L. D.; GUSTIN, J. A.; PFEFFER, S. R.; PFEFFER, L. M.; DONNER, D. B. NF-kappaB activation by tumor necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. **Nature**, v.401, p.82–85, 1999.

PACHER, P.; BÁTKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacological reviews**, v.58(3), p.389-462, 2006.

PANT, D.; REYNOLDS, L. P.; LUTHER, J. S.; BOROWICZ, P. P.; STENBAK, T. M.; BILSKI, J. J.; WEIGL, R.M.; LOPES, F.; PETRY, K.; JOHNSON, M. L.; REDMER, D. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T. Expression of connexin 43 and gap junctional intercellular communication in the *cumulus*–oocyte complex in heep. **Reproduction**, v.129(2), p.191-200, 2005.

PARK, B.; LEE, H.; LEE, Y.; ELAHI, F.; LEE, J.; LEE, S. T.; PARK, C. K.; HYUN, S. H.; LEE, E. Cilostamide and forskolin treatment during pre-IVM improves preimplantation development of cloned embryos by influencing meiotic progression and gap junction communication in pigs. **Theriogenology**, v.86(3), p.757-65, 2016.

PAULINI, F., SILVA, R. C., DE PAULA RÔLO, J. L. J., & LUCCI, C. M. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. **Journal of ovarian research**, v.7(1), p.102, 2014.

PAYTON, R. R.; ROMAR, R.; COY, P.; SAXTON, A. M.; LAWRENCE, J. L.; EDWARDS, J. L. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. **Biology of reproduction**, v.71(4), p.1303-1308, 2004.

PERREIRA, J. L. Efeito da inibição da PI3K pelo Wortmannin na concentração do AMPc e na 15 atividade do MPF na maturação *in vitro* de complexos *cumulus* oophorus bovinos. Dissertação de 16 Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), 2015.

PONDERATO, N.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; TURINI, P.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. **Mol Reprod Dev**, v.60, p.579–585, 2001.

QIAN, Y.; CORUM, L.; MENG, Q.; BLENIS, J.; ZHENG, J. Z.; SHI, X.; Flynn, D. C.; JIANG, B. H. PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.286(1), p.153-163, 2004.

REDDY, P.; ADHIKARI, D.; ZHENG, W.J.; LIANG, S.; HAMALAINEN, T.; TOHONEN, V.; OGAWA, W.; NODA, T.; VOLAREVIC, S.; HUHTANIEMI, I.; LIU, K. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. **Hum Mol Genet**, v.18, p.2813-2824, 2009.

RIBEIRO, T. I. da SILVA. Efeito da inibição da proteína quinase b (AKT) na maturação citoplasmática e na produção *in vitro* de embriões bovinos. Monografia, Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), 2017.

RICHARD, F.; SIRARD, M. A. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction** v.54(1), p.22-8, 1996.

RICHARDS J. S.; PANGAS, S.A. The ovary: basic biology and clinical implications. **The Journal of Clinical Investigation**, v.120, p.963-972, 2010.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. **Biology of reproduction**, v.82(6), p.1021-1029, 2010.

ROMASHKOVA, J. A.; MAKAROV, S. S. NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. **Nature**, v.401, p.86–90, 1999.

SASSEVILLE, M.; CÔTÉ, N.; GAGNON, M. C.; RICHARD, F. J. Upregulation of 3'5'-cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase in the porcine *cumulus*-oocyte complex affects steroidogenesis during *in vitro* maturation. **Endocrinology**, v.149, p.5568-76, 2008.

SCHMITT, A.; NEBREDA, A.R. Inhibition of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by catalytically inactive protein kinase A. **Proc Natl Acad Sci.**, v.99, p.4361–4366, 2002.

SHIMADA, M. Regulation of oocytes meiotic resumption by somatic cells. Oocyte Physiology and Development in Domestic Animal. 1ª Edição. Lone Tree. Editora: John & Sons, Inc, 2013.

SHIMIZU, T.; TOLCHER, A. W.; PAPADOPOULOS, K. P.; BEERAM, M.; RASCO, D. W.; SMITH, L. S.; GUNN, S.; SMETZER, L.; MAYS, T.A.; KAISER, B.; WICK, M. J.; ALVAREZ, C.; CAVAZOS, A.; MANGOLD, G. L.; PATNAIK, A. The clinical effect of the dual-targeting strategy involving PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways in patients with advanced cancer. **Clinical Cancer Research**, v.18(8), p.2316-2325, 2012.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241–54, 2001.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of reproduction**, v.64(3), p.904-909, 2001.

STROBECH, L.; MAZZONI, G.; PEDERSEN, H. S.; FREUDE, K. K.; KADARMIDEEN, H. N.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. *In vitro* production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. **Animal Reproduction**, v.12(3), p.465-472, 2015.

SUN, Q. Y.; WU, G. M.; LAI, L.; PARK, K. W.; CABOT, R.; CHEONG, H. T.; DAY, B. N.; PRATHER, R. S.; SCHATTEN, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. **Reproduction**, v.122(1), p.155-163, 2001.

SUN, X.; DEY, S. K. Endocannabinoid signaling in female reproduction. **ACS Chem. Neurosci**, v.3, p.349–355, 2012.

THOMAS, J. G.; THOMPSON, D.T.; ARMSTRONG; GILCHRIST, R. B. Effect of Specific Phosphodiesterase Isoenzyme Inhibitors During *In vitro* Maturation of Bovine Oocytes on Meiotic and Developmental Capacity. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1142–1149, 2004.

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Bovine *cumulus* cell-oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. **Biol Reprod**, v.70(3), p.548-56, 2004

TOMEK, W.; SMILJAKOVIC, T. Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to 32 metaphase II transition in bovine oocytes. **Reproduction**, v.130 p.423–430, 2005.

TROTT, D. W.; LUTTRELL, M.J.; SEAWRIGHT, J. W.; WOODMAN, C. R. Aging impairs PI3K/Akt signaling and NO-mediated dilation in soleus muscle feed arteries. **Eur J Appl Physiol**, v.113(8), p.2039-46, 2013.

TZIVION, G.; HAY, N. PI3K-AKT-FoxO axis in cancer and aging. **Biochim Biophys Acta**, v.1813(11) p.1925, 2011.

UZBEKOVA, S.; SALHAB, M.; PERREAU, C.; MERMILLOD, P.; DUPONT, J. Glycogen synthase kinase 3B in bovine oocytes and granulosa cells: possible involvement in meiosis during *in vitro* maturation. **Reproduction**, v.138(2), p.235-246, 2009.

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.

VAN WEZEL, I. L.; RODGERS, R. J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biology of reproduction**, v.55(5), p.1003-1011, 1996.

WANG, W.; HOSOE, M.; LI, R.; SHIOYA, Y. Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. **Development, growth & differentiation**, v.39(5), p.607-615, 1997.

WU, P.; HU, Y.Z. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in cancer: a perspective on clinical progress. **Current Medicinal Chemistry**, v.17(35), p.4326-41, 2010.

YAP, T. A.; YAN, L.; PATNAIK, A.; FEAREN, I.; OLMOS, D.; PAPADOPOULOS, K.; BAIRD, R.D.; DELGADO, L.; TAYLOR, A.; LUPINACCI, L.; RIISNAES, R.; POPE, L.L.; HEATON, S.P.; THOMAS, G.; GARRETT, M.D.; SULLIVAN, D.M.; DE BONO, J.S.; TOLCHER, A. W. First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. **Journal of clinical oncology**, v.29(35), p.4688-4695, 2011.

YIN, X.; XU, Z.; ZHANG, Z.; LI, L.; PAN, Q.; ZHENG, F.; LI, H. Association of PI3K/AKT/mTOR pathway genetic variants with type 2 diabetes mellitus in Chinese. **Diabetes Res Clin Pract.**, v.128, p.127-135, 2017.

ZHANG, M.; ZHANG, C. X.; PAN, L. Z.; GONG, G.; CUI, W.; YUAN, H. J.; ZHANG, W. L.; TAN, J. H. Meiotic arrest with roscovitine and follicular fluid improves cytoplasmic maturation of porcine oocytes by promoting chromatide-condensation and gene transcription. **Sci Rep.**, v.7, p.11574, 2017.