



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

LETICIA PEREIRA ALCARÁZ DE ANDRADE

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA VIA
PI3K/AKT/PTEN NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE
OÓCITOS MAMÍFEROS: UMA REVISÃO
SISTEMÁTICA**

Dissertação de Mestrado submetida a Universidade Federal Fluminense visando
à obtenção do grau de Mestre em Ciências e Biotecnologia

**Orientadores: Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan
Ângelo José Burla Dias**



Niterói
2021

LETICIA PEREIRA ALCARÁZ DE ANDRADE

**Efeito da modulação da via PI3K/AKT/PTEN na maturação
in vitro de oócitos mamíferos: uma revisão sistemática**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Preparo de Meios e Produção *In vitro* de Embriões, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense.
Apoio Financeiro: CAPES, CNPq e FAPERJ.

Dissertação de Mestrado
Submetida à Universidade
Federal Fluminense como
requisito parcial visando à
obtenção do grau de Mestre em
Ciências e Biotecnologia

**Orientadores: Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan
Ângelo José Burla Dias**

FICHA CATALOGRAFICA

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

A553e Andrade, Leticia Pereira Alcaráz de
Efeito da inibição da via PI3K/AKT/PTEN na maturação in vitro de oócitos mamíferos: uma revisão sistemática / Leticia Pereira Alcaráz de Andrade ; Joanna Maria Gonçalves Souza Fabjan, orientadora ; Angelo José Burla Dias, coorientador. Niterói, 2021.
65 f. : il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPBI.2021.m.17841463740>

1. Reprodução animal. 2. Fisiologia da reprodução. 3. In vitro. 4. Bioquímica veterinária. 5. Produção intelectual. I. Fabjan, Joanna Maria Gonçalves Souza, orientadora. II. Dias, Angelo José Burla, coorientador. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia. IV. Título.

CDD -

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

LETICIA PEREIRA ALCARÁZ DE ANDRADE

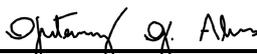
Efeito da modulação da via PI3K/AKT/PTEN na maturação *in vitro* de oócitos mamíferos: uma revisão sistemática

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências e Biotecnologia

Banca Examinadora:



Prof.^a Dra. Joanna M. Gonçalves de Souza Fabjan – Departamento de Patologia e Clínica Veterinária – UFF (Orientadora/Presidente)



Prof. Dr. Gutemberg Gomes Alves – Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFF



Prof. Dr. Felipe Perecin – Departamento de Medicina Veterinária – USP



Prof. Dr. Leonardo Araújo de Abreu – Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade – NUPEM – UFRJ

AGRADECIMENTOS

Eu sou enormemente agradecida pelo Programa de Pós-graduação em Ciências e Biotecnologia, a Universidade Federal Fluminense e a CAPES, que me proporcionaram o conhecimento que adquiri, professores excelentes e receber o título de mestre. Acredito que cresci muito dentro de um programa interdisciplinar, que me fez abrir meus horizontes e discutir assuntos tão diferentes do que eu estava habituada.

A finalização desse mestrado significa muita coisa para mim e, por conta disso, peço licença para extrapolar um pouco meus agradecimentos para alcançar, também, a minha esfera pessoal.

Eu iniciei o mestrado com muita força e certeza do que eu queria. Mas comecei a me sentir mal psicologicamente e sem entender muito o que estava acontecendo. Comecei a ter acompanhamento e as coisas foram se organizando, eu fui me acalmando. Mas a pandemia chegou e eu entrei de cabeça em um estado depressivo muito difícil por conta de todo o isolamento e síndrome de impostor que eu estava sentindo. Eu me via sozinha, sem querer contato com ninguém, com alterações repentinas de humor e me sentia frequentemente um fracasso. E tudo isso se agravou com o término do meu relacionamento. Eu nunca pensei que ficaria num estado mental tão complicado e eu nem via saída. Eu agradeço imensamente aos meus pais por terem me segurado, por sempre me darem apoio e acreditarem em mim, quando nem eu acreditei. Eu nem sei o que seria de mim sem eles. Por segurarem os meus choros frequentes, meus surtos (que não foram poucos) e a tristeza constante. Agradeço a minha psicóloga Mariana e meu psiquiatra Paulo, porque eu não *seria* se eles não estivessem presentes. Eu tive que me *reconhecer* durante esse período. Eu tive que reaprender que eu tinha amigos, que eu podia contar com todos eles, e que eu não precisava ter medo de me abrir e mostrar minhas vulnerabilidades. E, além disso, eu tive que reaprender quem eu sou, o que eu gosto de fazer, e aonde eu quero chegar. Nesse meio do caminho eu percebi que não era feliz dentro da pesquisa acadêmica e precisei conversar francamente com a minha orientadora. E, para falar a verdade, a Joanna é muito mais do que uma orientadora para mim.

Ela foi paciente e me fez caminhar no meu tempo, entendendo as dificuldades que eu estava passando. E sempre me ouviu, sempre se fez presente. Ela abriu as portas de um mestrado para mim e acreditou demais na minha capacidade. E se hoje eu consegui terminar a minha dissertação, ela tem uma grande parcela de responsabilidade.

Eu não acho que fui pelo caminho mais fácil. Talvez até poderia ter facilitado um pouquinho para mim. Mas eu me propus a escrever uma revisão sistemática, algo que quase não tinha tido contato. E foi *muito* difícil. Pensei em desistir inúmeras vezes. Eu peguei uma força em mim que eu nem sabia que existia para conseguir terminar a revisão. Eu fiquei meses sem um dia de lazer para conseguir finalizar. Meses sem olhar para mim e o que estava acontecendo ao meu ao redor porque eu só era movida pela vontade de finalizar. Eu sei o quanto isso pode soar negativo, mas são poucas as pessoas que sabem exatamente tudo o que eu passei e o quanto eu precisava fechar esse ciclo na minha vida.

Como minha mãe me contou, eu sou a primeira da família inteira a receber o título de mestre. Além disso, eu me tornei uma mulher independente, que batalha pelo meu futuro. Que ainda se sente um pouco perdida sobre sua carreira, mas que quer vencer muito na vida. Eu tenho orgulho de mim, por tudo que superei e tudo que hoje eu almejo. Foram muitas batalhas. *Muitas*. E muita gente torcendo por mim.

Eu não podia deixar passar e agradecer aos meus amigos. À Jamila, por ter um coração tão lindo, o melhor colo e escuta. À Grace por sempre se fazer presente, querer saber como estou e virar a vida de ponta cabeça para poder me ajudar. À Thais, que me aproximei quando estava no meu pior momento e que, mesmo assim, nunca desistiu de mim, sempre correu comigo. À Juliana, que compartilhou os sentimentos, choramos e crescemos juntas, e hoje é uma melhor amiga que eu não esperava encontrar. À Lucia, minha parceirinha do crime do mestrado, foi muito bom dividir tudo com você. Ao Calebe, por me escutar, propor maluquices e sempre querer meu bem. Ao Dimitri, que mesmo muito longe, ainda me acalenta como ninguém. Ao Paulo, por ser um grande amigo que eu levo da faculdade para minha vida. Agradeço ainda à Penthouse, um lugar que eu pude

chamar de casa, que me abraçou no momento de vulnerabilidade, que me jogou para cima e me distraiu, e que me acolheu até o momento em que parou de fazer sentido. Além de agradecer a todos de dentro da faculdade que me acompanharam e ajudaram nas rotinas: Gabi, Paulo Victor, Rachel, Erlândia e Lucas (o que seria do meu experimento sem ele?).

Agradeço ao Ângelo por propor o tema do meu mestrado, por ver capacidade em mim, pelas reuniões, orientações e conversas, eu te admiro *muito!* Novamente, agradeço a Joanna, por ser uma referência para mim. Eu fico triste de ter que deixar para trás o laboratório que tanto me acolheu e que eu esperava poder contribuir mais, mas eu sei que eu preciso correr atrás do que faz mais sentido pra mim. Mas eu ainda volto para contar o que aconteceu!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	X
Lista de ilustrações	XIII
Resumo	XVII
Abstract	XVIII
1. Introdução	19
1.1 Ciclo celular	20
1.2 Meiose	21
1.3 Foliculogênese e oogênese	21
1.4 Maturação oocitária	23
1.4.1 Maturação nuclear	23
1.4.2 Maturação citoplasmática	24
1.4.2.1 Maturação molecular	25
1.5 Mecanismos de modulação da maturação oocitária <i>in vitro</i>	26
1.6 Papel da via PI3K/AKT/PTEN	27
1.6.1 Modulação da via PI3K/AKT/PTEN durante a MIV	28
2. Objetivos	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. Material e métodos.....	32
3.1 Critérios de elegibilidade.....	32
3.2 Identificação/triagem dos estudos.....	32
3.3 Avaliação da qualidade	33
3.4 Extração dos dados	34
4. Resultados	34
4.1 Caracterização dos artigos incluídos	37
4.1.1 Suínos.....	38
4.1.2 Bovinos	41
4.1.3 Murinos	44
5. Discussão	47
6. Considerações finais	54
6.1 Conclusões	54

6.2 Perspectivas	54
7. Referências bibliográficas	56

LISTA DE ABREVIATURAS

3MA	3-metiladenina
AKT	Proteína quinase B
AREG	Anfirregulina
ATP	Adenosina trifosfato
BAD	Promotor de morte celular associado à BCL-2
BAX	Proteína X associada a BCL-2
BCL-2	Célula B de linfoma 2
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CCs	Células do <i>cumulus</i>
cdc2	Quinase dependente de ciclina
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
CGs	Células da granulosa
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Oócito desnudo
E2	Estradiol

ECG	Gonadotrofina coriônica equina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FCS	Soro fetal bovino
FF-MAS	Esteróide ativador da meiose do fluido folicular
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GSK3	Glicogênio sintase quinase 3
GVBD	Quebra da vesícula germinativa
HCG	Gonadotrofina coriônica humana
Hx	Hipoxantina
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
LH	Hormônio luteinizante
LY	LY294002
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MPF	Fator promotor da maturação
mRNA	RNA mensageiro
mTORC1	Alvo mamífero de rapamicina 1
mTORC2	Alvo mamífero de rapamicina 2

PDE3	Fosfodiesterase 3
PDK1	Quinase dependente de fosfoinosítídeo
PFF	Fluido folicular suíno
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PICO	População, intervenção, comparador e desfecho
PIP	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PIP ₂	Fosfatidilinositol-3,4-bifosfato
PIP ₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-fosfato
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PKA	Proteína quinase A
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TGF- α	Fator de crescimento transformador alfa
Wo	Wortmannin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A via da fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase e tensina homóloga (PI3K/AKT/PTEN) em mamíferos e seus inibidores diretos. A PI3K é ativada por insulina, esteroides ou fatores de crescimento e atua na catálise de fosfatidilinositóis de acordo com as classes de PI3K. Os PI3Ks de classe I atuam na catálise do fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) a partir do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2). Junto a isso, a classe II atua na conversão do fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP) em PIP2. Além disso, a classe III produz PIP por meio da catálise de fosfatidilinositol (PI). Existem inibidores diretos específicos que atuam em cada classe de PI3K, como: LY294002 (LY), que só se liga à classe I; PTEN, que é um regulador negativo intrínseco de mesma classe; 3MA, que atua nas classes I e III; e Wortmannin (Wo), que pode se ligar covalentemente a todas as três classes. Esta produção de subprodutos de fosfatidilinositol recruta quinase dependente de fosfatidilinositol (PDK1) para a membrana, que fosforila AKT. A via segue pela fosforilação da fosfodiesterase 3 (PDE3), que reduz os níveis de cAMP e, por consequência, inibe a proteína quinase A (PKA), desencadeando a retomada da meiose por ativação do fator promotor da meiose (MPF)

29

Figura 2: Fluxograma da identificação, triagem, elegibilidade e inclusão dos artigos da revisão sistemática sobre a modulação da via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase e tensina homóloga (PI3K/AKT/PTEN) durante a maturação *in vitro* de oócitos de mamíferos sobre a retomada e progressão da meiose.....

35

Figura 3: Resumo das evidências da inibição da via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase e tensina homóloga (PI3K/AKT/PTEN) durante a maturação *in vitro* de oócitos suínos. Considerando a

suplementação de inibidores diretos de PI3K e AKT, com ou sem adição de hormônios e/ou fonte proteica e seus efeitos na retomada e progressão da meiose. Abreviaturas: COC: complexo cumulus-oócito; DO: oócitos desnudos; FSH: hormônio folículo-estimulante; LY: LY294002; FCS: soro fetal bovino; FFMAS: esterol ativador da meiose do fluido folicular..... 49

Figura 4: Resumo das evidências da inibição da via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase e tensina homóloga (PI3K/AKT/PTEN) durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Considerando a suplementação de inibidores diretos de PI3K e AKT, com ou sem adição de hormônios e/ou fonte proteica e seus efeitos na retomada e progressão da meiose. Abreviaturas: COC: complexo cumulus-oócito; DO: oócitos desnudos; FSH: hormônio folículo-estimulante; LY: LY294002; FCS: soro fetal bovino; FFMAS: esterol ativador da meiose do fluido folicular..... 50

Figura 5: Resumo das evidências da inibição da via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase e tensina homóloga (PI3K/AKT/PTEN) durante a maturação *in vitro* de oócitos murinos. Considerando a suplementação de inibidores diretos de PI3K e AKT, com ou sem adição de hormônios e/ou fonte proteica e seus efeitos na retomada e progressão da meiose. Abreviaturas: COC: complexo cumulus-oócito; DO: oócitos desnudos; FSH: hormônio folículo-estimulante; LY: LY294002; FCS: soro fetal bovino; FFMAS: esterol ativador da meiose do fluido folicular..... 51

Figura 6: Resumo das evidências debatidas nos artigos incluídos da revisão sistemática sobre a modulação da via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase e tensina homóloga (PI3K/AKT/PTEN) durante a maturação *in vitro* de oócitos de mamíferos. Considerando a suplementação de inibidores diretos de PI3K e AKT, com ou sem adição de hormônios e/ou fonte proteica, no meio de maturação *in vitro* de suínos, bovinos e murinos e seus efeitos na retomada e progressão da meiose. Abreviaturas: COC: complexo cumulus-oócito; DO: oócitos desnudos; FSH: hormônio folículo-estimulante; Wo: wortmannin; LY: LY294002; 3MA: 3-

metiladenina EGF: fator de crescimento epidérmico; FCS: soro fetal bovino;
ECG: gonadotrofina coriônica equina; HCG: gonadotrofina coriônica
humana; Hx: hipoxantina; AREG: anfirregulina; FFMAS: esterol ativador da
meiose do fluido folicular..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise da qualidade dos artigos incluídos na revisão sistemática a respeito da modulação da via PI3K/AKT/PTEN durante a maturação <i>in vitro</i> de oócitos de mamíferos.....	36
Tabela 2: Lista de artigos e experimentos que avaliaram os efeitos da inibição da via PI3K/AKT/PTEN durante a maturação <i>in vitro</i> (MIV) sobre a retomada da meiose e/ou progressão à metáfase II de suínos.....	39
Tabela 3: Lista de artigos e experimentos que avaliaram os efeitos da inibição da via PI3K/AKT/PTEN durante a maturação <i>in vitro</i> de complexos <i>cumulus</i> -oócitos sobre a o cultivo <i>in vitro</i> (CIV) de embriões suínos.....	40
Tabela 4: Lista de artigos e experimentos que avaliaram os efeitos da inibição da via PI3K/AKT/PTEN durante a maturação <i>in vitro</i> (MIV) sobre a retomada da meiose e/ou progressão à metáfase II de bovinos.....	42
Tabela 5: Lista de artigos e experimentos que avaliaram os efeitos da inibição da via PI3K/AKT/PTEN durante a maturação <i>in vitro</i> (MIV) de complexos <i>cumulus</i> -oócitos sobre a o cultivo <i>in vitro</i> (CIV) de embriões bovinos, após fertilização <i>in vitro</i> . Efeitos sobre as taxas de CIV foram categorizados de acordo com a análise estatística de cada artigo e seu próprio grupo controle.....	43
Tabela 6: Lista de artigos e experimentos que avaliaram os efeitos da inibição da via PI3K/AKT/PTEN durante a maturação <i>in vitro</i> (MIV) sobre a retomada da meiose e/ou progressão à metáfase II de murinos.....	45

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica de alta valia para conservação de espécies em extinção, agronegócio e casais em tratamento de fertilidade. A via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase e tensina homóloga (PI3K/AKT/PTEN) em oócitos parece controlar eventos meióticos por regulação de níveis de nucleotídeos cíclicos. Entretanto, a modulação dessa via em mamíferos produz resultados contrastantes. Um aprofundamento teórico em relação à sua regulação pode ser utilizado para maior eficiência da PIVE. Portanto, esta revisão sistemática tem como objetivo mapear as evidências da modulação da via PI3K/AKT/PTEN durante a maturação *in vitro* (MIV) e avaliar os efeitos sobre a retomada da meiose e progressão da maturação nuclear de oócitos de mamíferos, além dos impactos sobre a qualidade e desenvolvimento embrionário. Para isso, buscas foram realizadas nas bases PubMed, Web of Science e Scopus, resultando em um total de 431 artigos após remoção de replicatas. Destes, 37 foram lidos na íntegra e somente 20 foram incluídos. Foram extraídos 48 experimentos de MIV e, em 11 deles, os oócitos seguiram até a etapa de cultivo *in vitro*. Nestes experimentos, foram utilizados três inibidores de PI3K (3-metiladenina, Wortmannin e LY294002) e um inibidor de AKT (SH6). Os dados sugerem que enquanto o controle da retomada da meiose em bovinos parece ser independente da via PI3K/AKT/PTEN, em suínos e murinos, a modulação gerou informações conflitantes, sendo dependente do inibidor e/ou concentração utilizados e a suplementação do meio. Somado a isto, a progressão à metáfase II (MII) em murinos ainda não foi bem estabelecida, entretanto, em bovinos e suínos é altamente controlada pela via. Estudos que buscaram analisar a reversibilidade da inibição mostraram que o uso dos moduladores somente nas primeiras horas de MIV, seguido pela retirada deles do meio produziu taxas de MII semelhantes às do grupo controle. Junto a isso, experimentos que visaram bloquear temporariamente a retomada da meiose ou reduzir a atividade de PI3K resultaram na produção de blastocistos igual ou superior à apresentada no grupo controle. Juntos, esses dados indicam o importante potencial dessa via como uma possível estratégia para sincronização das maturações nuclear e citoplasmática, levando à maior eficiência geral da produção *in vitro* de embriões.

Palavras-chave: LY294002, SH6, 3MA, wortmannin, PIVE

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVP) is a highly valuable biotechnology for the conservation of endangered species, agribusiness and couples undergoing fertility treatment. The phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/phosphatase and tensin homologue (PI3K/AKT/PTEN) pathway in oocytes appears to control meiotic events by regulating cyclic nucleotide levels. However, inhibition of this pathway in mammals yields mixed results. A deep understanding of its regulation can be a powerful tool to improve IVP. Therefore, this systematic review aims to map the articles in which the PI3K/AKT/PTEN pathway was modulated during *in vitro* maturation (IVM) to assess its effects on meiosis resumption and nuclear maturation progression of mammalian oocytes, and their impacts on embryo development and quality. For that, PubMed, Web of Science, and Scopus database were searched, and a total of 431 articles were screened, 37 were fully read, and 20 were selected and included. Out of those, it was possible to extract 48 IVM experiments and, in 11 of them, blastocyst yield was evaluated. Three PI3K inhibitors (3-methyladenine, Wortmannin, and LY294002) and one AKT inhibitor (SH6) were described. While in bovines, the meiosis resumption seemed to be pathway-independent, the impact of this pathway modulation in swines and murines was not well established, depending on the inhibitor used, concentration, and media supplementation. However, the progression to metaphase II (MII) is highly controlled by PI3K/AKT/PTEN pathway on both bovines and swines, but not in murines. Studies that focused on the reversibility of the inhibition showed that the removal of the modulator after an inhibitory period produced MII rates similar to the control group. Along with that, experiments that aimed to temporarily block meiosis resumption or reduce PI3K activity resulted in blastocyst production equal to or even higher than the control groups. Altogether, these data indicate the paramount potential of this pathway as a possible strategy to improve the overall *in vitro* embryo production efficiency, by aiming at synchronizing both nuclear and cytoplasmic maturation.

Keywords: LY294002, SH6, 3MA, wortmannin, IVP

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica extremamente versátil, sendo aplicada na produção de animais geneticamente valiosos no agronegócio, o que contribui para a melhor qualidade dos rebanhos (KANE, 2003). Além disso, tem um importante papel na conservação de animais em risco de extinção e estabelecimento de bancos de germoplasma, sendo ainda uma ótima fonte de embriões para pesquisa reprodutiva básica humana e animal (FERRÉ *et al.*, 2020; SARTORI *et al.*, 2016).

Para mimetizar os processos fisiológicos a nível folicular, oocitário e embrionário-inicial, a técnica de PIVE envolve três importantes etapas: maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), culminando com a produção de blastocistos (LONERGAN E FAIR, 2016). Os resultados dessa biotecnologia são muito variáveis entre as espécies (SJUNNESSON, 2020), que é, dentre outras razões, resultante de diferentes níveis de estudo da fisiologia básica de cada grupo animal. Entretanto, mesmo em espécies de interesse econômico, em que há um grande esforço para alta eficiência da técnica, as taxas se mantêm inferiores às desejadas. Um dos fatores que impactam a eficiência da PIVE é a quantidade de blastocistos produzidos em cada rotina, o que está relacionado à qualidade intrínseca do oócito e da MIV.

O papel da via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase homóloga à tensina (PI3K/AKT/PTEN) já foi amplamente explorado na literatura a respeito de terapias e doenças como o câncer de mama (ABRAHAM, 2014), pulmão (ZHENG *et al.*, 2012), leucemia (BLUNT E STEELE, 2015), doenças neurodegenerativas (SHIMOHAMA, 2009) e diabetes (ENGELMAN *et al.*, 2006). Além disso, atua durante o processo de retomada e progressão da meiose em oócitos de *Xenopus* e peixe-zebra (ANDERSEN *et al.*, 2003; DAS *et al.*, 2018). Entretanto, em mamíferos, o controle da quebra da vesícula germinativa (GVBD) e progressão à MII pela via ainda não é bem caracterizado, apresentando dados contrastantes entre as espécies (ANAS *et al.*, 1998). Nesse sentido, esta revisão sistemática visa mapear as evidências da modulação da via PI3K / AKT / PTEN durante a MIV e avaliar os efeitos sobre a retomada da meiose e progressão da

maturação nuclear de oócitos de mamíferos, e os impactos subsequentes sobre a qualidade e desenvolvimento embrionário.

1.1. CICLO CELULAR

O ciclo celular é um processo de alta complexidade e regulação molecular, que prepara as células para crescimento e proliferação. Durante seu curso, a célula passa por duas importantes etapas: intérfase (G1, S e G2) e divisão (M). Em G1, a célula se prepara para síntese de DNA, armazenando fatores hormonais, nutricionais e de crescimento, além de verificar as condições citoplasmáticas e nucleares, permitindo ou não seu progresso. Na fase S, ocorre a replicação propriamente dita do DNA. Já em G2, ocorre a checagem do processo anterior e os reparos necessários. Uma vez que todos os fatores sejam favoráveis, a célula finalmente entra na fase M, em que há dissolução do envelope nuclear, segregação cromossômica e divisão celular, resultando em duas células-filhas, teoricamente idênticas. (DORÉE E HUNT, 2002; JONGSMA *et al.*, 2015; NOVAK *et al.*, 1998; SCHAFER, 1998).

A fase de mitose é subdividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase. Na prófase, há condensação da cromatina, formando, por sua vez, os cromossomos, e dissolução do envelope nuclear. Já na metáfase, os cromossomos se encontram alinhados, formando a placa metafásica. Em seguida, há segregação das cromátides irmãs e migração delas para polos opostos (centrossomos), caracterizando a anáfase. Por fim, na telófase há reconstrução do envelope nuclear ao redor das cromátides recém segregadas, seguido por citocinese, processo de separação efetiva das células-filhas. Toda movimentação dos cromossomos/cromátides é coordenada pela ação de microtúbulos do fuso mitótico ligados aos cinotocoros, localizados na posição central de cada cromátide (JONGSMA *et al.*, 2015; MACGREGOR *et al.*, 2019; SILKWORTH E CIMINI, 2012).

1.2. MEIOSE

A meiose do gameta feminino é um tipo de divisão celular altamente especializada por formar um único oócito secundário, com a extrusão de dois corpúsculos polares. Para isso, ocorrem dois ciclos celulares em sequência. Na primeira divisão (meiose I), há duplicação do DNA, *crossing-over* – processo que ocorre durante a prófase, em que o material genético de cada cromossomo homólogo é recombinado, com consequente promoção da variabilidade genética – e segregação dos cromossomos homólogos. Já na meiose II, não há fase S na intérfase, portanto não há nova síntese de DNA. Além disso, é somente na anáfase II que ocorre a segregação das cromátides-irmãs (LOIDL, 2016; MACGREGOR *et al.*, 2019; MARSTON E AMON, 2004).

1.3. FOLICULOGÊNESE E OOGÊNESE

A foliculogênese é o processo de formação, desenvolvimento e maturação das células somáticas circundantes ao oócito. Já a oogênese, compreende a formação, crescimento e maturação do gameta feminino. Nos mamíferos, ambos processos ocorrem de forma síncrona, com alta complexidade e regulação por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. Eles se iniciam durante o desenvolvimento embrionário, ainda no período pré-natal, com o estabelecimento e colonização por rápida proliferação mitótica das células germinativas primordiais nas futuras gônadas femininas (GILCHRIST *et al.*, 2008; GRIVE *et al.*, 2015; IKAMI *et al.*, 2017). Logo em seguida, essas células primordiais se multiplicam por mitoses sucessivas e se diferenciam em oogônias, que por sua vez, também sofrem sucessivas mitoses. Posteriormente, as oogônias entram na primeira divisão meiótica (estágio de prófase I) e passam a ser denominadas de oócitos. Neste momento, os oócitos (denominados de primários) são circundados por células somáticas (pré-granulosa), circundadas por membrana basal. As estruturas formadas são denominadas de folículos primordiais e constituem a reserva ovariana, definindo a vida reprodutiva do indivíduo (ADHIKARI E LIU, 2009; GRIVE E FREIMAN, 2015; IKAMI *et al.*, 2014).

Em fêmeas em idade reprodutiva, periodicamente um pequeno grupo de folículos primordiais é recrutado e se desenvolve a cada onda de crescimento folicular, formando os folículos primários. Estes caracterizam-se pela morfologia cuboide das células da granulosa (CGs) (EL-HAYEK E CLARKE, 2015; MATZUK *et al.*, 2002; VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). Em seguida, com a formação de duas ou mais camadas de CGs, o folículo se denomina secundário. Neste estágio, há produção de matriz glicoproteica em torno do oócito (zona pelúcida), o estabelecimento das células da teca e o início do estabelecimento de comunicação entre oócito-CGs via *gap junctions* nas extremidades das projeções transzonais (EL-HAYEK E CLARKE, 2015; LI *et al.*, 2013; MAKKER *et al.*, 2014; VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). A partir desse momento, a foliculogênese entra em processo de transição entre as fases pré-antral e antral. Assim, o folículo se torna responsivo e dependente de gonadotrofinas. Nesse ponto, a maioria desses folículos sofre atresia pela ausência do pico de hormônio luteinizante (LH) (ZELEZNIK, 2004).

O hormônio folículo-estimulante (FSH) é responsável pela proliferação, crescimento e início da diferenciação das CGs em células do *cumulus* (CCs) e murais, expressão de receptores de LH, aumento da vascularização folicular e, conseqüente formação do antro, que contém moléculas regulatórias, fatores de crescimento, esteroides e enzimas. Já o LH, atua sobre o término da diferenciação das CGs, expansão e mucificação das CCs e regulação da produção de andrógenos pelas células da teca, substrato da síntese de estrogênio pelas células murais. Além disso, para o oócito, o pico de LH é essencial, uma vez que permite a retomada da meiose até o estágio de metáfase II (MII). A finalização da meiose só ocorrerá com a sinalização celular proveniente da fertilização. Ademais, com a ruptura do folículo, ocorre a ovulação, processo em que há liberação do oócito juntamente com as CCs circundantes, o chamado complexo *cumulus*-oócito (COC). As CGs da parede folicular e as células da teca seguem diferenciação para formação do corpo lúteo, responsável pela produção de progesterona (DUGGAVATHI E MURPHY, 2009; MAKKER *et al.*, 2014; WIGGLESWORTH *et al.*, 2015).

1.4. MATURAÇÃO OOCITÁRIA

A maturação dos oócitos é um evento fisiológico extremamente regulado e coordenado por fatores presentes no fluido folicular e transferidos ao oócito por projeções transzonais. Este processo corresponde a todos os eventos nucleares, citoplasmáticos e moleculares compreendidos no decurso celular do gameta incluso no folículo antral (HENNET E COMBELLES, 2012; LI *et al.*, 2013).

De forma fisiológica, os eventos das maturações nuclear e citoplasmática são regulados para que ocorram ao mesmo tempo, viabilizando a qualidade dos futuros processos de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (EPPIG, 1996). Entretanto, a competência meiótica, capacidade do oócito de iniciar esses eventos, ocorre de forma independente. Em folículos pré-antrais, o núcleo do oócito já possui todas as condições necessárias para o início da maturação, enquanto o citoplasma somente adquire este potencial em folículos antrais (COMIZZOLI *et al.*, 2011).

1.4.1. Maturação nuclear

Em oócitos de mamíferos, a maturação nuclear compreende os eventos meióticos a partir da retomada da meiose I, no estágio de prófase I, até nova pausa no estágio de MII. Assim, após estímulo resultante do pico pré-ovulatório de LH, há perda da membrana nuclear, caracterizando a GVBD, e condensação dos cromossomos, seguida de organização do fuso e migração cromossômica. Assim, a primeira meiose se encerra com a extrusão do primeiro corpúsculo polar no espaço perivitelínico. Depois, há progressão da meiose II até o estágio de MII e nova pausa, por atividade do fator citostático (DEKEL, 2005; FAIR, 2013; SCHMITT E NEBREDA, 2002). O mecanismo inibitório da progressão da meiose é decorrente de variações na concentração de nucleotídeos cíclicos (GILCHRIST *et al.*, 2016) e atuação de diferentes vias de sinalização, que posteriormente levam à ativação do fator promotor da meiose (MPF) (SCHMITT E NEBREDA, 2002).

Anteriormente ao pico de LH e conseqüente início da maturação oocitária, altos níveis de cGMP e cAMP intraoocitários são mantidos por fluxo contínuo das

CGs e CCs por *gap junctions*, o que permite ativação da proteína quinase A (PKA), regulando negativamente o MPF. Uma importante enzima presente no oócito e responsável pela hidrólise do cAMP é a fosfodiesterase 3A (PDE3A). Porém, com intuito de manter o cAMP em altas concentrações neste momento da pré-maturação, cGMP atua como inibidor da ação fosfodiesterase (GILCHRIST *et al.*, 2016; RAMOS LEAL *et al.*, 2018).

A atuação do LH sobre os receptores presentes nas CGs ainda não é muito bem definida. Ao que se tem conhecimento, o pico pré-ovulatório de LH age sobre as células foliculares disparando uma cascata de sinalização via secreção de peptídeos semelhantes a fatores de crescimento epidermais, que resulta em queda nas concentrações de cGMP, aumento da atividade de PDE3A e consequente redução do cAMP intraocitário (DUNNING E ROBKER, 2017; SHUHAIBAR *et al.*, 2015), que leva à ativação do MPF.

O MPF é um heterodímero constituído pelas subunidades regulatória e catalítica, ciclina B1 e quinase dependente de ciclina (*cdc2*), respectivamente (CARNERO; LACAL, 1998). O processo de ativação dessa molécula é altamente controlado molecularmente e espacialmente. Para manutenção da inativação, existe atuação das proteínas Wee1 e Myt1 sobre o MPF no núcleo celular. Com a redução dos níveis de nucleotídeos cíclicos e, portanto, inativação de PKA, *cdc25* é translocada e atua na desfosforilação da subunidade catalítica do MPF. Ao ser ativado, esse fator induz a realocação e exportação das proteínas Wee1/Myt1 para o citoplasma. Isso proporciona um aumento da atividade do MPF, resultando em GVBD e retomada da meiose (OH *et al.*, 2010).

1.4.2. Maturação Citoplasmática

A maturação citoplasmática envolve modificações morfológicas e bioquímicas que visam remodelar o gameta para fertilização e integração do genoma masculino, reprogramação celular e ativação do genoma embrionário (CONTI E FRANCIOSI, 2018). Portanto, este processo está envolvido na aquisição de competência oocitária (KRISHER, 2004).

A regulação da maturação citoplasmática ainda é pouco entendida. Porém, sabe-se que o microambiente folicular é determinante para que o evento ocorra de forma eficiente. Alguns promotores já foram identificados, como o EGF, TGF- α , ativina, inibina, esteroides ativadores de meiose presentes no fluido folicular (FF-MAS), leptina e midquina, além de moduladores de níveis de cAMP, como hipoxantina (Hx) e FSH (YAMADA E ISAJI, 2011).

Durante a maturação citoplasmática há redistribuição, replicação e modificações morfológicas de organelas, além do rearranjo do citoesqueleto e acúmulo de mRNA, proteínas e fatores de transcrição (FERREIRA *et al.*, 2009; VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). A função do rearranjo espacial de organelas não é largamente conhecida, porém sabe-se que tem grande papel na aquisição de competência oocitária ao desenvolvimento (CONTI E FRANCIOSI, 2018).

O citoesqueleto é constituído por microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários, que se polimerizam e despolimerizam de forma rápida. Estes filamentos proporcionam o reposicionamento das organelas, movimentação de moléculas, disposição do fuso, alinhamento da placa metafásica, segregação cromossômica, divisão celular e extrusão do corpúsculo polar (FERREIRA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2013). Os grânulos corticais são organelas exclusivas do oócito e possuem glicosaminoglicanos, proteínas e enzimas em seu interior, moléculas importantes para o bloqueio da polispermia durante a fertilização, e desencadeamento da reação acrossomal. Para isso, é necessário que migrem para região periférica da célula (FERREIRA *et al.*, 2009). Já as mitocôndrias são as organelas envolvidas na maior parte da produção de ATP intra-oocitário. Por conta disso, é necessário que elas estejam presentes nos locais de maior requerimento energético de cada estágio do desenvolvimento (YAMADA E ISAJI, 2011). A distribuição dessa organela no citoplasma de oócitos mamíferos varia entre espécies.

1.4.2.1. Maturação Molecular

A maturação molecular corresponde ao acúmulo de mRNA, proteínas e fatores de transcrição durante todo o crescimento e maturação do oócito, sendo

responsável por todo o metabolismo anterior à ativação do genoma embrionário (BREVINI GANDOLFI; GANDOLFI, 2001). Além disso, envolve a transcrição posterior do material genético materno e o processamento de mRNAs envolvidos nos processos de maturação, fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário inicial (FERREIRA *et al.*, 2009; SIRARD *et al.*, 2006).

1.5. MECANISMOS DE MODULAÇÃO DA MATURAÇÃO OOCITÁRIA *IN VITRO*

A PIVE cresceu em grandes passos nos últimos 40 anos (NIEDERBERGER *et al.*, 2018). Enquanto em humanos permitiu solucionar a infertilidade de casais, nos animais, ela é utilizada como uma ferramenta para conservação de espécies e proporciona grandes avanços na pecuária. Entretanto, um grande fator limitante ainda é a qualidade oocitária, que determina toda a eficiência da técnica (SIRARD *et al.*, 2006). Por conta disso, é imprescindível que sejam entendidos os mecanismos moleculares e de sinalização para a retomada e progressão da meiose, quando na condição *in vitro*.

Uma importante interferência na técnica *in vitro*, que compromete o desenvolvimento embrionário subsequente, é devido a retirada dos COCs do ambiente folicular. Isso corta o fluxo de nucleotídeos cíclicos das CGs para o oócito, gerando assincronia nos eventos nucleares e citoplasmáticos da maturação oocitária. Assim, permite-se que o oócito retome a meiose sem que o citoplasma esteja preparado para tal, o que caracteriza a maturação nuclear prematura e dissincronia com a maturação citoplasmática (MEHLMANN, 2005). Desses nucleotídeos cíclicos, o cAMP, principalmente, é a chave para inativação ou ativação do MPF, sendo responsável pela manutenção em vesícula germinativa ou estímulo para a retomada, respectivamente (YUAN *et al.*, 2017).

Focada na sincronização dos eventos nucleares e citoplasmáticos da MIV, uma importante estratégia é a inibição temporária da maturação nuclear espontânea (GILCHRIST *et al.*, 2007), e consequente manutenção de elevadas concentrações de cAMP. Para isso, podem ser utilizados reagentes químicos, como bucladesina, forskolina, Hx, xantosina e purinas. Além disso, podem ser

utilizados inibidores de PDE, como isobutilmetilxantina (IBMX), org9935, cilostamida, mirlinona e rolipram. Ademais, a inibição de enzimas chave da maturação, como quinases dependentes de ciclinas, MPF, proteínas quinases e inibidores de síntese proteica também podem ser uma estratégia interessante para maior qualidade oocitária e eficiência da PIVE (PARK *et al.*, 2011; RAMOS LEAL *et al.*, 2018).

1.6. PAPEL DA VIA PI3K/AKT/PTEN

As PI3Ks são pertencentes a uma família altamente conservada de lipídio quinases responsáveis por catalisar reações de fosforilação no grupamento 3'-hidroxila de fosfoinositóis, que desencadeiam na ativação de diversas vias de sinalização intracelular (ENGELMAN *et al.*, 2006; VANHAESEBROECK *et al.*, 2010). São heterodímeros constituídos de uma subunidade catalítica e uma regulatória, que se diferenciam dentre as três classes (I, II e III) descritas, de acordo com a preferência de substrato. As PI3K de classe I catalisam a reação de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). As de classe II, por sua vez, preferencialmente atuam sobre a modificação de fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP) em PIP₂. Já as enzimas de classe III, produzem PIP através da catálise de fosfatidilinositol (PI) (ENGELMAN *et al.*, 2006).

A AKT é uma enzima localizada *downstream* à PI3K, sendo regulada pela atividade da quinase dependente de fosfoinositideo 1 (PDK1). Após ativação de PDK1 por PI3K, AKT é fosforilada e se torna ativa (CECCONI *et al.*, 2012; NICHOLSON E ANDERSON, 2002). Já o PTEN é um inibidor intrínseco da atividade de PI3K classe I, regulando, portanto, o nível de atividade da PI3K ao hidrolisar PIP₃ em PIP₂ (CARRACEDO E PANDOLFI, 2008).

A respeito das funções da via, a descrição da regulação de eventos fisiológicos em células somáticas é vasta, participando de (1) proliferação e progressão do ciclo celular através de inativação de Foxo3 e estabilização indireta de Myc e Cyc D1; (2) sobrevivência e apoptose, ao inibir proteínas pró-apoptóticas (BAX, BAD, Forkhead, p53) e ativar proteínas pró-sobrevivência (BCL2); (3) crescimento e metabolismo lipídico, ativando de forma indireta a via

mTORC1; (4) metabolismo de carboidratos, por inibição indireta de GSK3, envolvida na síntese de glicogênio; e (5) rearranjo do citoesqueleto, por atuação da via mTORC2 (CANTLEY, 2002; COHEN E FRAME, 2001; MAKKER *et al.*, 2014).

No tecido ovariano, estudos genéticos utilizando o modelo murino indicaram que a via intraocitária regula a sobrevivência e ativação dos folículos primordiais, enquanto nas CGs, a via controla a proliferação e a diferenciação celular em resposta a gonadotrofinas (ZHENG *et al.*, 2012). Além disso, foram realizadas inibições da via para o maior entendimento dos efeitos sobre a autofagia (SHEN *et al.*, 2018), esteroidogênese, viabilidade e desenvolvimento embrionário inicial (DE SOUZA *et al.*, 2018), desenvolvimento folicular (LIU *et al.*, 2007) e inibição da maturação oocitária (HOSHINO *et al.*, 2004).

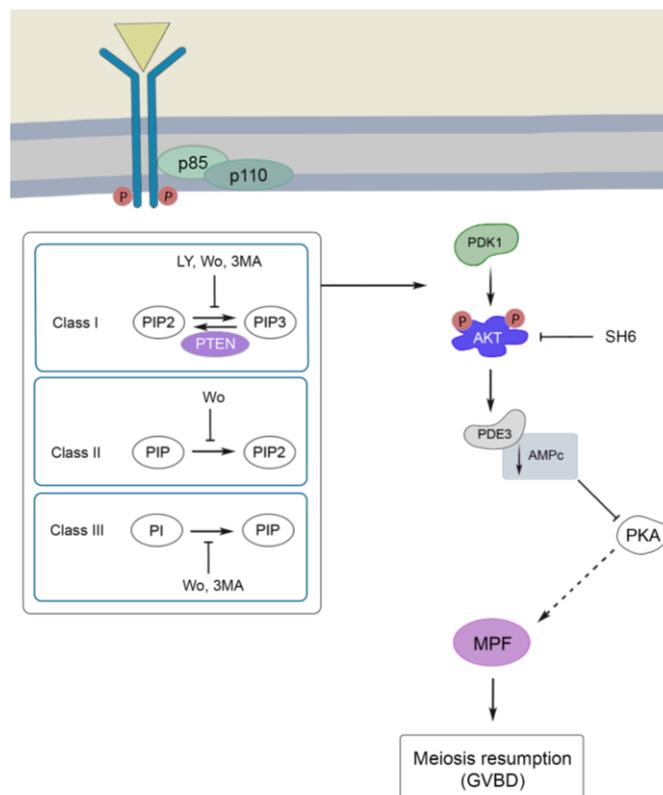
1.6.1. Modulação da via PI3K/AKT/PTEN durante a MIV

Alguns moduladores podem ser utilizados para elucidar o papel de cada uma das proteínas da via, suas relações com outras moléculas e seus mecanismos de ação (SMITH, 2010). Eles podem ser ativadores ou inibidores, dependendo de suas características e mecanismo de ligação às proteínas alvo. Para a via PI3K/AKT/PTEN, são descritos inúmeros moduladores, dada sua importância fisiológica e clínica, participando de eventos que levam a carcinogênese e desenvolvimento de doenças autoimunes e psiquiátricas.

Alguns dos inibidores diretos da PI3K são LY294002 (LY), wortmannin (Wo) e 3-metiladenina (3MA). Eles competem diretamente pelo sítio de ATP, entretanto variam de acordo com a natureza de sua ligação e origem. O LY é um inibidor reversível sintético, derivado do flavonoide quercetina, que se liga à PI3K de classe I (WALKER *et al.*, 2000). A ligação é bastante estável em solução e, por conta disso, é amplamente utilizado na literatura (GHARBI *et al.*, 2007). Já o Wo é um metabolito fúngico não específico, inibindo todas as classes de PI3K por ligação covalente, de forma irreversível (WALKER *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2016). Além disso, o 3MA é conhecido por inibir autofagia, sendo específico para PI3K classe III de forma reversível, entretanto, recentemente foi demonstrado que

também é capaz de inibir classe I irreversivelmente. A respeito de moduladores de AKT, SH6 é um análogo de fosfatidilinositol e atua ao impedir a hidrólise do ATP e a consequente ativação de AKT (ASHRY *et al.*, 2018) (Figura 1).

Figura 1: A via da fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase e tensina homóloga (PI3K/AKT/PTEN) em mamíferos e seus inibidores diretos. A PI3K é um heterodímero formado pelas subunidades p85 e p110. Ela é ativada por insulina, esteroides ou fatores de crescimento e atua na catálise de fosfatidilinositóis de acordo com as classes de PI3K. As PI3Ks de classe I atuam na catálise do fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) a partir do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2). Já a classe II, atua na conversão do fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP) em PIP2. Além disso, a classe III produz PIP por meio da catálise de fosfatidilinositol (PI). Alguns dos inibidores diretos específicos que atuam em cada classe de PI3K, são: LY294002 (LY), que se liga à classe I; PTEN, que é um regulador negativo intrínseco de mesma classe; 3MA, que atua nas classes I e III; e Wortmannin (Wo), que pode se ligar covalentemente a todas as três classes. Esta produção de subprodutos de fosfatidilinositol recruta quinase dependente de fosfatidilinositol (PDK1) para a membrana, que fosforila AKT. A via segue pela fosforilação da fosfodiesterase 3 (PDE3), que reduz os níveis de cAMP e, por consequência, inibe a proteína quinase A (PKA), desencadeando a retomada da meiose por ativação do fator promotor da meiose (MPF).



A modulação da via PI3K/AKT/PTEN foi estudada em *Xenopus* e peixe-zebra, mostrando a importância da via para retomada da meiose, uma vez que com a adição de inibidores de PI3K ou AKT, GVBD foi bloqueada momentaneamente ou por completo (ANDERSEN *et al.*, 2003; DAS *et al.*, 2018). Por outro lado, em mamíferos, os resultados se mostram variáveis entre espécie e inibidor usado, demonstrando que pode haver singularidades na cascata de sinalização da via. Além disso, o uso do modulador durante a MIV pode gerar consequências sobre o desenvolvimento embrionário. Um dos possíveis resultados é a melhoria da sincronização das maturações nuclear e citoplasmática, melhorando a eficiência da PIVE, como descrito por PEREIRA *et al.* (2020).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

A presente revisão sistemática tem como objetivo geral mapear as evidências da modulação da via PI3K/AKT/PTEN durante a MIV e avaliar os efeitos sobre a retomada da meiose e progressão da maturação nuclear de oócitos de mamíferos, e os impactos subsequentes sobre a qualidade e desenvolvimento embrionário.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar em quais espécies já foram estudados os efeitos da modulação da via PI3K/AKT/PTEN durante a MIV;
- Apresentar e discutir os moduladores, seus alvos e concentrações já estudadas, correlacionando com os efeitos sobre a retomada e progressão da meiose;
- Identificar os efeitos da modulação já descritos na literatura sobre as taxas de MIV, FIV e CIV, considerando ainda possíveis impactos sobre a qualidade do oócito/embrião e taxas de apoptose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Todos os critérios foram definidos anteriormente à busca nas bases de dados, baseando-se na estratégia de população, intervenção, comparador e desfechos (PICO) para definição da pergunta estruturada da revisão (“Qual o efeito da adição de inibidores da via PI3K/AKT/PTEN durante a MIV de oócitos mamíferos sobre a retomada e progressão da meiose?”), sendo P= oócitos mamíferos; I= suplementação de moduladores de PI3K, AKT ou PTEN durante a MIV; C= oócitos não modulados; e O= efeito sobre a retomada e progressão da meiose e, caso disponível, taxas de qualidade e desenvolvimento embrionário subsequentes. Somente artigos originais foram incluídos e não houve distinção a respeito de data de publicação ou idioma.

As bases eletrônicas PubMed (Medline), Web of Science (WoS) e Scopus foram extensivamente buscadas em maio de 2021. Para o PubMed, foi utilizada a seguinte chave: (“PI3K” OR “phosphoinositide 3-kinase” OR “phosphatidylinositol 3-kinase” OR “wortmannin” OR “ly294002” OR “tricitiribine” OR “akt” OR “pkb” OR “protein kinase b” OR PTEN OR “phosphataseandtensinhomolog”) AND (“inhibit*” OR “modulat*”) AND (“ovocyte” OR “egg” OR “oocyte” OR “COC” OR “cumulus-oocyte”) AND (“embryo*” OR “embryo production” OR “*in vitro* embryo production” OR “*in vitro* maturation” OR “*in vitro* fertilization” OR “*in vitro* development” OR “*in vitro* embryo development” OR “*in vitro* culture” OR “ivm” OR “ivf” OR “ivc” OR “ivd” OR “blastocyst*” OR “cleavage” OR “embryo quality” OR “embryo viability” OR “*in vitro*” OR “meiotic maturation” OR “cytoplasmatic maturation”)). Particularidades de cada base para construção da chave de busca foram consideradas e ajustadas para WoS e Scopus.

3.2. IDENTIFICAÇÃO/TRIAGEM DOS ESTUDOS

Artigos duplicados foram identificados no gerenciador de referências Mendeley Desktop (V-1.19.8). Sequencialmente, as referências foram exportadas para o Rayyan (OUZZANI *et al.*, 2016) e a triagem foi realizada inicialmente pela leitura do título e resumo de cada artigo por dois revisores de forma

independente. Em um segundo momento, foi realizada a leitura total dos artigos pré-selecionados para confirmar a elegibilidade.

Os critérios de exclusão foram determinados anteriormente à busca e se enquadraram quando o artigo: (1) era de outro assunto (*off-topic*); (2) não apresentou seção de análise estatística ou informações quanto aos valores de significância (sem suporte estatístico); (3) era categorizado como revisão ou estudos clínicos (tipo de publicação); (4) não estudou a via PI3K/AKT/PTEN (via enzimática); (5) utilizou um inibidor indireto e/ou em outro momento, que não a MIV (desenho experimental); (6) estudou a inibição em outras células que não oócitos de mamíferos (população); ou (7) não avaliou taxas de GVBD e/ou MII (desfecho). Qualquer discordância entre os revisores sobre a inclusão/exclusão ou categorização foram discutidos e resolvidos por dois outros revisores.

Diferentes condições experimentais dentro do mesmo artigo foram avaliadas de forma independente e, portanto, considerou-se o número de experimentos totais, tanto para etapas de MIV e pós-MIV (desenvolvimento *in vitro* ou partenogênético).

3.3. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE

A avaliação da qualidade dos estudos foi analisada com base em WHITTEMORE E KNAFL (2005). Para isso, os artigos foram avaliados separadamente por sua qualidade técnica e adequação à pergunta da revisão, subdividindo-se em dois parâmetros, respectivamente: desenho experimental e metodologia descrita; e objetivo e modulação da MIV. Foi realizada pontuação de cada um desses parâmetros, como 0 (ausente) e 1 (presente). Para qualidade técnica, foi analisado somente se havia ou não descrição detalhada da metodologia e se era pertinente ao objetivo do artigo. Já para os critérios de adequação à revisão, o objetivo de cada artigo foi analisado e foi considerado como presente se o uso dos inibidores pretendia diretamente inibir a via, enquanto também foi analisado se houve adição de algum modulador de cAMP durante a coleta dos oócitos. Nenhum artigo foi excluído devido a esta avaliação,

entretanto a qualidade definiu o peso de que as evidências poderiam ser avaliadas.

3.4. EXTRAÇÃO DOS DADOS

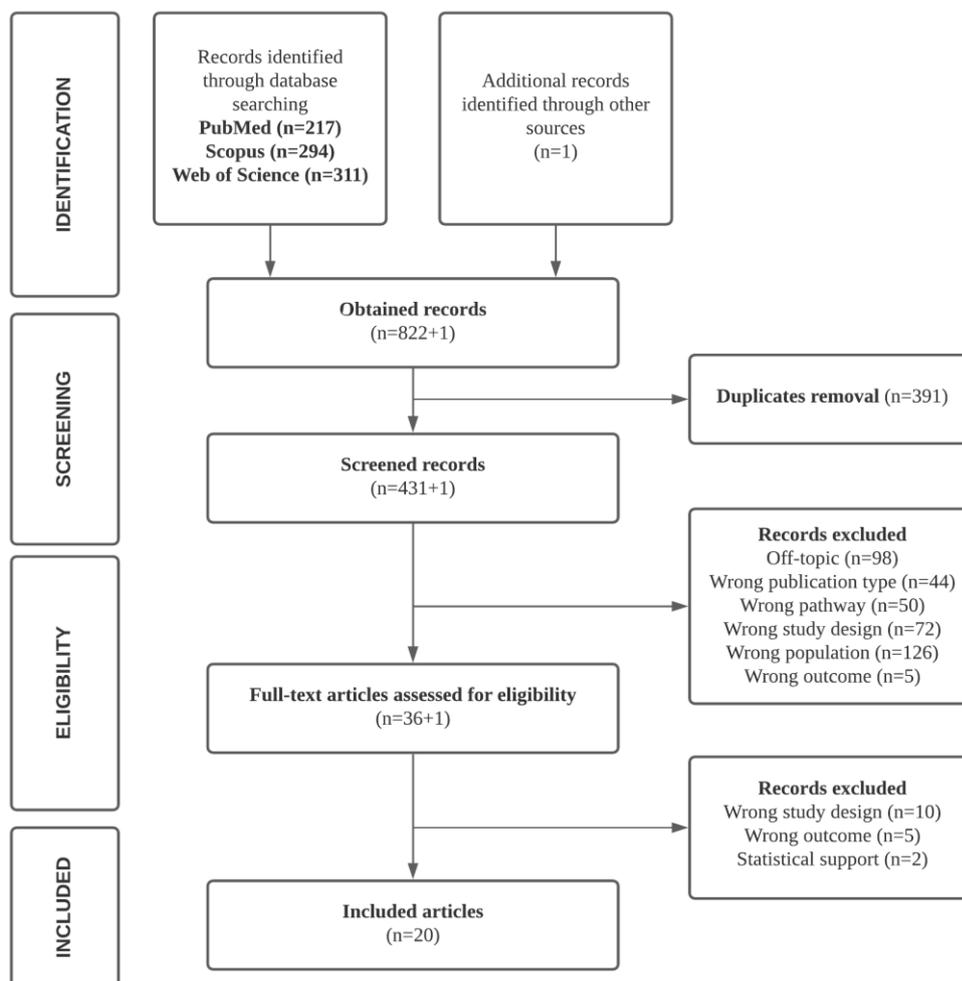
Informação a respeito de espécie, moduladores e concentração utilizada, tempo de MIV e taxas de maturação foram obrigatoriamente extraídas de todos os experimentos incluídos. Para melhor verificação do efeito do inibidor sobre a MIV, a retomada e progressão da meiose foram avaliados, considerando-se as taxas de GVBD e MII, respectivamente. Informações a respeito das etapas subsequentes até o estágio de blastocisto também foram compiladas, caso disponíveis, analisando-se a qualidade e desenvolvimento embrionário.

Todos os dados extraídos foram avaliados baseando-se na análise estatística de cada artigo. Cada experimento foi caracterizado como positivo ou negativo a respeito do efeito da adição do inibidor sobre as taxas de retomada e progressão da meiose. Assim, quando a adição de qualquer concentração do inibidor promoveu a inibição das taxas supracitadas, foi considerado positivo. Ao passo que a ausência de inibição nas taxas, considerou-se negativo.

4. RESULTADOS

Foram obtidos 431 artigos a partir da busca nas três bases de dados e remoção de replicatas. Um artigo foi incluído manualmente após revisão de todas as referências incluídas em cada um dos artigos. Após triagem, 37 artigos foram lidos na íntegra, para verificação dos critérios de inclusão e dois artigos foram removidos por não conterem em detalhes a análise estatística ou os valores de significância (KALOUS *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2012). Um total de 20 foram selecionados e incluídos nessa revisão sistemática (Figura 2).

Figura 2: Fluxograma da identificação, triagem, elegibilidade e inclusão dos artigos da revisão sistemática sobre a modulação da via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase e tensina homóloga (PI3K/AKT/PTEN) durante a maturação *in vitro* de oócitos de mamíferos sobre a retomada e progressão da meiose.



A análise de qualidade indicou que 50% dos artigos incluídos abrangiam todos os parâmetros avaliados (Tabela 1). Nove artigos apresentaram alguma divergência quanto à adequação à revisão. A respeito do objetivo, o inibidor foi utilizado para induzir a apoptose (EL SHEIKH *et al.*, 2019), analisar autofagia (SHEN *et al.*, 2018), entender o papel do FHS e AREG sobre a via (PROCHAZKA *et al.*, 2012), e a correlação entre a via e PKC (LIU *et al.*, 2018), CaMKII (LIU *et al.*, 2019) e Aurora Quinase A (SASKOVA *et al.*, 2008). Já quanto à adição de moduladores pré-MIV, IBMX (LI *et al.*, 2008; SASKOVA *et al.*, 2008), Hx

(HOSHINO *et al.*, 2004) e dibutiril-cAMP (KALOUS *et al.*, 2009) foram utilizados. Além disso, dois artigos apresentaram ausência de algum parâmetro de qualidade técnica, devido a falta de detalhamento metodológico (LIU *et al.*, 2018) e desenho experimental inadequado, por conta do uso de meio sequencial com/sem inibidores para avaliar o efeito da inibição da via (SONG *et al.*, 2018).

Tabela 1. Análise da qualidade dos artigos incluídos na revisão sistemática a respeito da modulação da via PI3K/AKT/PTEN durante a maturação *in vitro* de oócitos de mamíferos.

Artigo, ano	Qualidade técnica		Adequação à revisão		Total
	Desenho experimental	Detalhamento metodológico	Objetivo	Modulação da MIV	
Anas <i>et al.</i> 1998	1	1	1	1	4
Anas <i>et al.</i> 2000	1	1	1	1	4
De Souza <i>et al.</i> 2018	1	1	1	1	4
Sheikh <i>et al.</i> 2019	1	1	0	1	3
Hoshino <i>et al.</i> 2004	1	1	1	0	3
Jiao <i>et al.</i> 2020	1	1	1	1	4
Kalous <i>et al.</i> 2009	1	1	1	0	3
Li <i>et al.</i> 2008	1	1	1	0	3
Liu <i>et al.</i> 2018	1	0	0	1	2
Liu <i>et al.</i> 2019	1	1	0	1	3
Park <i>et al.</i> 2011	1	1	1	1	4
Pereira <i>et al.</i> 2020	1	1	1	1	4
Prochazka <i>et al.</i> 2012	1	1	0	1	3
Saskova <i>et al.</i> 2008	1	1	0	0	2
Shen <i>et al.</i> 2018	1	1	0	1	3
Shimada <i>et al.</i> 1998	1	1	1	1	4
Shimada <i>et al.</i> 1999	1	1	1	1	4
Shimada <i>et al.</i> 2003	1	1	1	1	4
Song <i>et al.</i> 2018	0	1	1	1	3
Tomek & Smiljakovic 2005	1	1	1	1	4

Cada artigo foi pontuado em um sistema binário, sendo a qualidade técnica avaliada pela presença (1) ou ausência (0) de descrição detalhada da metodologia e se esta era pertinente ao objetivo do artigo (1) ou não (0). Para os critérios de adequação à revisão, o objetivo de cada artigo foi analisado e verificado se o uso dos inibidores pretendia diretamente inibir a via (1) ou não (0), enquanto também foi analisado se houve adição de algum modulador de cAMP (0) durante a coleta dos oócitos ou não (1).

4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ARTIGOS INCLUÍDOS

A modulação direta da via PI3K/AKT/PTEN durante a MIV em mamíferos foi relatada somente em bovinos (n=6), murinos (n=4) e suínos (n=10). Os estudos iniciaram-se na década de 1990, e o número de publicações durante os anos cresceu e depois estabilizou (1990: 3; 2000: 7; 2010: 8). Este padrão parece ser mantido na década de 2020, uma vez que nos dois primeiros anos, há somente duas publicações sobre o tema. Por conta de pequenas alterações das condições experimentais dentro de um mesmo artigo, foi possível extrair 48 experimentos de MIV e 11 que avaliaram os efeitos nas etapas pós-MIV. As variações visualizadas foram a respeito do modulador, suplementação do meio, estrutura cultivada (COC ou oócito desnudo – DO), tempo de MIV e exposição aos inibidores, e método de ativação (FIV ou ativação partenogenética).

Foram estudados o uso de três inibidores diretos de PI3K – 3MA, Wo, LY – e um de AKT (SH6), contabilizando quatro (0,8%), 14 (29%), 22 (45%) e oito (16%) experimentos, respectivamente. Não foram encontrados artigos explorando o uso de ativadores de PTEN. A taxa de retomada da meiose, avaliada por GVBD, foi analisada em 81% (39/48) dos experimentos, surtindo efeito positivo em 17 (44%). Já a progressão à MII foi analisada em 54% (26/48) dos experimentos, apresentando efeito positivo em 81%. Somente 35% (17/48) dos experimentos verificaram concomitantemente o efeito dos inibidores sobre a retomada e a progressão da meiose.

O uso dos inibidores durante a MIV e seus efeitos nas etapas posteriores foram somente relatados em sete artigos (35%), sendo possível extrair 11 experimentos, que estudam sua aplicação somente em bovinos e suínos, portanto, ainda não há literatura a respeito em murinos. Desses, 64% (7/11) reportaram ativar realizando a FIV e 36%, por PA. Todos esses experimentos avaliaram o desenvolvimento embrionário, enquanto somente em 46% (5/11) destes, a qualidade embrionária também foi verificada.

4.1.1. Suínos

Foram extraídos 10 artigos em suínos e, para estudos da MIV, foram considerados 21 experimentos (Tabela 2), que avaliaram o efeito de LY (52%), Wo (14%), 3MA (19%) e SH6 (14%). Já a respeito do pós-MIV (Tabela 3), foram descritos somente quatro artigos, em cinco condições experimentais. Os inibidores LY, Wo e 3MA foram estudados em 40%, 20% e 40%, respectivamente.

Dos nove experimentos que analisaram a retomada da meiose após a MIV suplementada de LY, 56% (5/9) e 44% (4/9) apresentaram efeitos positivos e negativos, nessa ordem. No que diz respeito à avaliação de progressão, todos os experimentos (4/4) exibiram efeitos positivos. As concentrações adicionadas durante a MIV de COCs variaram de 10^{-7} a 10^{-4} M. O efeito positivo do inibidor na retomada da meiose foi percebido com a suplementação de 5×10^{-6} M e $1 - 7.5 \times 10^{-5}$ M (LI *et al.*, 2008; PROCHAZKA *et al.*, 2012; SHIMADA *et al.*, 1998; SHIMADA *et al.*, 2003), e negativo com 10^{-7} , $1 - 5 \times 10^{-6}$ e $1 - 5 \times 10^{-5}$ M (LI *et al.*, 2008; PROCHAZKA *et al.*, 2012; SHIMADA E TERADA, 1999; SHIMADA *et al.*, 2003). Já para progressão, as concentrações de 1 e 5×10^{-6} e $1 - 5 \times 10^{-5}$ M geraram efeitos positivos (JIAO *et al.*, 2020; PROCHAZKA *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2018), e 5×10^{-6} , 1 e 2×10^{-5} , e 10^{-4} M, efeitos negativos (JIAO *et al.*, 2020; PROCHAZKA *et al.*, 2012). Em DOs, as concentrações de 5×10^{-6} e 5×10^{-5} M resultaram na inibição de GVBD (SHIMADA *et al.*, 1998), entretanto em LI *et al.* (2008), a mesma concentração (5×10^{-5} M) gerou efeitos negativos. Dois experimentos analisaram o efeito da suplementação de LY durante a MIV sobre as etapas subsequentes. Das concentrações estudadas ($10^{-6} - 10^{-4}$ M), somente 2 e 5×10^{-5} M foram capazes de reduzir a taxa de clivagem (JIAO *et al.*, 2020). Já a taxa de produção de blastocistos, foi reduzida com a adição de 10^{-6} , 5 e 2×10^{-5} M (JIAO *et al.*, 2020; SHEN *et al.*, 2018). Somente um deles analisou a qualidade embrionária, apresentando redução da taxa de blastômeros/embrião (JIAO *et al.*, 2020).

Tabela 2. Lista de artigos e experimentos que avaliaram os efeitos da inibição da via PI3K/AKT/PTEN durante a maturação *in vitro* (MIV) sobre a retomada da meiose e/ou progressão à metáfase II de suínos.

Referência	Inibidor	COC/ DO	Dose (M)	Exp/ Dur (h)	Meio de MIV (fonte proteica e hormônios)	Efeitos sobre*		
						Retomada	Progressão	
Park <i>et al.</i> 2011	3MA	COC	10 ⁻²	22	TCM-199; 10% PFF; 0.5 µg /mL FSH; 10 ng/mL EGF; 1 µg/mL E2	Positivo	-	
			10 ⁻²	42		Positivo	Positivo	
			DO	22		Positivo	-	
			10 ⁻²	42		Positivo	Positivo	
Shimada <i>et al.</i> 1999	LY	COC	5 x 10 ⁻⁵	12	NCSU37; 0.3% PVP	Negativo	-	
Li <i>et al.</i> 2008			10 ⁻⁷	24	TCM-199; 3 mg/mL BSA; 10 ng/mL EGF	Negativo	-	
10 ⁻⁶				Negativo		-		
10 ⁻⁵				Positivo		-		
5 x 10 ⁻⁵		Positivo	-					
Shimada <i>et al.</i> 1998			5 x 10 ⁻⁶	24	TCM-199; 10% FCS; 10 IU/mL ECG; 1 µg/mL E2; 10 IU/mL HCG	Positivo	-	
			5 x 10 ⁻⁵			Positivo	-	
			7.5 x 10 ⁻⁵			Positivo	-	
Shimada <i>et al.</i> 2003			5 x 10 ⁻⁶	24	NCSU37; 20 ng/mL FSH	Positivo	-	
			2 X 10 ⁻⁵			Positivo	-	
			5 x 10 ⁻⁶		NCSU37; 2 mM Hx	Negativo	-	
			2 X 10 ⁻⁵			Negativo	-	
Jiao <i>et al.</i> 2020			1 X 10 ⁻⁵	42-44	TCM-199; 10% FBS; 10% PFF; 10 IU/mL EGF; 10 IU/mL HCG	-	Negativo	
			2 X 10 ⁻⁵			-	Negativo	
			5 X 10 ⁻⁵			-	Positivo	
			10 ⁻⁴			-	Negativo	
Prochazka <i>et al.</i> 2012			5 x 10 ⁻⁶	42	M-199; 5% FCS; 100 ng/mL AREG	Positivo	Positivo	
			10 ⁻⁵			Positivo	Positivo	
			2 x 10 ⁻⁵			Negativo	Positivo	
			5 x 10 ⁻⁵			Negativo	Positivo	
			5 x 10 ⁻⁶			M-199; 5% FCS; 1 UI/mL FSH	Negativo	Negativo
			10 ⁻⁵			Negativo	Positivo	
			2 x 10 ⁻⁵			Negativo	Positivo	
			5 x 10 ⁻⁵			Negativo	Positivo	
Shen <i>et al.</i> 2018			10 ⁻⁶	44	TCM-199; 10 ng/mL EGF; 10% PFF; 10 IU/mL FSH; 10 IU/mL LH	-	Positivo	
Li <i>et al.</i> 2008		DO	5 x 10 ⁻⁵	28	TCM-199; 3 mg/mL BSA; 10 ng/mL EGF	Negativo	-	
Shimada <i>et al.</i> 1998			5 x 10 ⁻⁶	24	TCM-199; 10% FCS; 10 IU/mL ECG; 1 µg /mL E2; 10 IU/mL HCG	Negativo	-	
			5 x 10 ⁻⁵			Negativo	-	
Kalous <i>et al.</i> 2009	SH6	DO	5 x 10 ⁻⁵	10	TCM-199; 5% BSA	Negativo	-	
			5 x 10 ⁻⁵	24		Negativo	Positivo	
			5 x 10 ⁻⁵	44		Negativo	Positivo	
Shimada <i>et al.</i> 1998	Wo	COC	10 ⁻⁹	24	TCM-199; 10% FCS; 10 IU/mL ECG; 1 µg/mL E2; 10 IU/mL HCG	Positivo	-	
			10 ⁻⁸			Positivo	-	
			10 ⁻⁷			Positivo	-	
			10 ⁻⁶			Positivo	-	

Song <i>et al.</i> 2018		1×10^{-6}	44	Sequential: (1) TCM-199; 10% PFF; 10 IU/mL ECG; 10 IU/mL HCG and (2) with no hormones/inibidor	-	Negativo
		5×10^{-6}			-	Negativo
		10^{-5}			-	Positivo
Shimada <i>et al.</i> 1998	DO	10^{-8}	24	TCM-199; 10% FCS; 10 IU/mL ECG; 1 μ g/mL E2; 10 IU/mL HCG	Positivo	-
		10^{-7}			Positivo	-

*O efeito positivo foi categorizado quando, com a adição do inibidor, foi possível observar a inibição das taxas, enquanto o efeito negativo foi considerado quando não há inibição. Abreviaturas: COC: complexo cumulus-oócito; DO: oócitos desnudos; Exp/Dur: exposição ao inibidor e duração da MIV; PFF: fluido folicular suíno; FSH: hormônio folículo-estimulante; Wo: wortmannin; LY: LY294002; 3MA: 3-metiladenina EGF: fator de crescimento epidérmico; E2: estradiol; BSA: albumina sérica bovina; FCS: soro fetal bovino; ECG: gonadotrofina coriônica equina; HCG: gonadotrofina coriônica humana; Hx: hipoxantina; AREG: anfirregulina; LH: hormônio luteinizante.

Tabela 3. Lista de artigos e experimentos que avaliaram os efeitos da inibição da via PI3K/AKT/PTEN durante a maturação *in vitro* de complexos *cumulus*-oócitos sobre a o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões suínos. Efeitos sobre as taxas de CIV foram categorizados de acordo com a análise estatística de cada artigo e seu próprio grupo controle.

Referência	Inibidor	Dose (M)	IVF/PA	Exp (h)	Dur (h)	Efeito sobre as taxas de:			
						Clivagem	Blastocisto	Blast/embrião	Apoptose
Jiao <i>et al.</i> 2020	LY	10^{-5}	PA	42-44	42-44	Similar	Similar	-	-
		2×10^{-5}					Similar	-	-
		5×10^{-5}				Redução	Redução	Redução	-
		10^{-4}				Similar	Redução	-	-
Shen <i>et al.</i> 2018		10^{-6}		44	44	Similar	Redução	-	-
Song <i>et al.</i> 2018	Wo	10^{-6}		22		-	Similar	Similar	Similar
		5×10^{-6}			-	Redução	Similar	Similar	
		10^{-5}			-	Redução	Redução	Similar	
Park <i>et al.</i> 2011	3MA	10^{-2}				Similar	Similar	Similar	-
		10^{-2}	IVF			Similar	Similar	Similar	-

Abreviaturas: LY: LY294002; Wo: wortmannin; 3MA: 3-metiladenina; FIV: fertilização *in vitro*; PA: ativado partenogeneticamente; Exp: duração da exposição ao inibidor; Dur: duração da maturação *in vitro*; Blast: blastômero; Similar: estatisticamente semelhante ao controle; Redução: estatisticamente inferior ao controle.

O uso de Wo foi avaliado em três experimentos. Em todos, o efeito foi positivo, sendo dois deles sobre as taxas de retomada e um para progressão da meiose (SHIMADA *et al.*, 1998; SONG *et al.*, 2018). Todas as concentrações utilizadas para estudo da retomada da meiose em COCs (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M)

e DOs (10^{-8} e 10^{-7} M) foram capazes de inibir GVBD (SHIMADA *et al.*, 1998). Já sobre a progressão, somente a concentração de 10^{-5} M foi capaz de resultar em efeito positivo, enquanto 1 e 5×10^{-6} M apresentaram efeito negativo (SONG *et al.*, 2018). As taxas de qualidade e desenvolvimento embrionário foram analisadas somente em um experimento, em que as concentrações de 5×10^{-3} e 10^{-2} M foram capazes de reduzir a taxa de blastocistos, enquanto a taxa de apoptose não foi alterada com a adição do inibidor (SONG *et al.*, 2018).

Quatro experimentos avaliaram a retomada, enquanto somente dois, a progressão da meiose com o uso de 3MA. Em todos, os efeitos foram categorizados como positivos. Somente a concentração de 10^{-2} M foi avaliada, tanto para COCs quanto em DOs (PARK *et al.*, 2011). Somente um experimento analisou os efeitos do inibidor sobre a FIV, demonstrando que a suplementação de 10^{-2} M de 3MA não impactou nas taxas de mono- e polispermia. O uso do inibidor foi avaliado sobre a qualidade e desenvolvimento embrionário em dois experimentos, sendo um ativado partenogeneticamente e outro fertilizado *in vitro*. Em ambos os experimentos, as taxas de clivagem e blastocistos, e o número de blastômeros/embrião foram similares ao controle (PARK *et al.*, 2011).

O uso de SH6 em suínos foi verificado em somente um artigo, que usou a concentração fixa de 5×10^{-5} M. Foram extraídos três experimentos em DOs que variaram somente o tempo de MIV (10, 24 ou 44 h). Com 24 ou 44 h, os resultados foram categorizados como negativos, porém com 10h, a retomada foi promovida. Entretanto, quando avaliada a progressão, o inibidor gerou impactos positivos quando observada em 24 ou 44h, ao reduzir a taxa de MII (KALOUS *et al.*, 2009).

4.1.2. Bovinos

Seis artigos descreveram o uso de moduladores da via durante a MIV, sendo possível extrair um total de 17 experimentos. Destes, quatro (24%) analisaram somente a retomada da meiose e seis (35%), a progressão. Em sete experimentos (41%), avaliou-se concomitantemente ambas as taxas (Tabela 4). Quatro (23%), 11 (65%) e dois (12%) analisaram a adição de LY, Wo e SH6, respectivamente. Além disso, seis experimentos investigaram os efeitos dos

inibidores nas etapas pós-MIV, sendo 33% (2/6) com LY, 50% (3/6) com Wo e 17% (1/6) com SH6 (Tabela 5).

Tabela 4. Lista de artigos e experimentos que avaliaram os efeitos da inibição da via PI3K/AKT/PTEN durante a maturação *in vitro* (MIV) sobre a retomada da meiose e/ou progressão à metáfase II de bovinos.

Referência	Inibidor	COC/ DO	Dose (M)	Exp (h)	Dur. (h)	Meio de MIV (fonte proteica e hormônios)	Efeitos sobre*	
							Retomada	Progressão
Anas <i>et al.</i> 1998	LY	COC	2.5 x 10 ⁻⁵	24	24	TCM-199; 10% FCS; 1.3 µg/mL LH; 0.6 µg/mL FSH	Negativo	Positivo
			5 x 10 ⁻⁵				Negativo	Positivo
			7.5 x 10 ⁻⁵				Negativo	Positivo
De Souza <i>et al.</i> 2018		COC	10 ⁻⁴	22-25	22-25	MIVB MIVB; 10 ng/mL FSH	-	Negativo
			10 ⁻⁴				-	Positivo
Anas <i>et al.</i> 1998		DO	2.5 x 10 ⁻⁵	24	24	TCM-199; 10% FCS; 1.3 µg/mL LH; 0.6 µg/mL FSH	Negativo	Negativo
			5 x 10 ⁻⁵				Negativo	Positivo
			7.5 x 10 ⁻⁵				Negativo	Positivo
Sheikh <i>et al.</i> 2019	SH6	COC	5 x 10 ⁻⁵	22-24	22-24	TCM-199; 1 µg/mL E2; 10 µg/mL FSH; 10 ng/mL EGF; 5% FCS	-	Positivo
Tomek & Smiljakovic 2005		COC	10 ⁻⁵	24	24	TCM-199; 3 mg/mL BSA	-	Negativo
			2.5 x 10 ⁻⁵				-	Negativo
			5 x 10 ⁻⁵				-	Positivo
			7.5 x 10 ⁻⁵				-	Positivo
Anas <i>et al.</i> 1998	Wo	COC	10 ⁻⁸	24	24	TCM-199; 10% FCS; 1.3 µg/mL LH; 0.6 µg/mL FSH	Negativo	Positivo
			10 ⁻⁷				Negativo	Positivo
			10 ⁻⁶				Negativo	Positivo
Anas <i>et al.</i> 2000		COC	10 ⁻⁷	4	4	TCM-199; 10% FCS; 1.3 µg/mL; 0.6 µg/ml FSH	Negativo	-
			10 ⁻⁷	6	6		Negativo	-
			10 ⁻⁷	8	8		Negativo	-
			10 ⁻⁷	10	10		Negativo	-
Pereira <i>et al.</i> 2020		COC	2 x 10 ⁻⁸	22	22	TCM-199; 5 µg/mL LH; 0.5 µg/mL FSH	Negativo	Positivo
			2 x 10 ⁻⁸	28	28		Negativo	Negativo
			2 x 10 ⁻⁸	34	34		Negativo	Negativo
			2 x 10 ⁻⁸	0,17	22		-	Positivo
			2 x 10 ⁻⁸	6	22		-	Positivo
Anas <i>et al.</i> 1998		DO	10 ⁻⁷	24	24	TCM-199; 10% FCS; 1.3 µg/mL LH; 0.6 µg/mL FSH	Negativo	Positivo
			10 ⁻⁶	24	24		Negativo	Positivo

*O efeito positivo foi categorizado quando, com a adição do inibidor, foi possível observar a inibição das taxas, enquanto o efeito negativo foi considerado quando não há inibição. Abreviaturas: COC: complexo cumulus-oócito; DO: oócitos desnudos; Exp: duração da exposição ao inibidor; Dur: duração da MIV; FSH: hormônio folículo-estimulante; EGF: fator de crescimento epidérmico; E2: estradiol; BSA: albumina sérica bovina; FCS: soro fetal bovino; LH: hormônio luteinizante.

Tabela 5. Lista de artigos e experimentos que avaliaram os efeitos da inibição da via PI3K/AKT/PTEN durante a maturação *in vitro* (MIV) de complexos *cumulus*-oócitos sobre a o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos, após fertilização *in vitro*. Efeitos sobre as taxas de CIV foram categorizados de acordo com a análise estatística de cada artigo e seu próprio grupo controle.

Referência	Inibidor	Dose (M)	Exp (h)	Dur. (h)	Efeito sobre as taxas de:			
					Clivagem	Blastocisto	Blast/embrião	Apoptose
DeSouza <i>et al.</i> 2018	LY	10 ^{-4*}	22-25	22-25	Similar	Similar	-	-
		10 ^{-4**}			Redução	Redução	-	-
Sheikh <i>et al.</i> 2019	SH6	2.5 x 10 ⁻⁵	22-24	22-24	Similar	Redução	-	-
		5 x 10 ⁻⁵			Redução	Redução	Redução	Aumento
		7.5 x 10 ⁻⁵			Redução	Redução	-	-
Pereira <i>et al.</i> 2020	Wo	2 x 10 ⁻⁸	0,17	22	Similar	Similar	-	-
		2 x 10 ⁻⁸	6		Similar	Similar	-	-
		2 x 10 ⁻⁸	22		Greater	Greater	-	-

*Inibição em meio básico **Inibição em meio contendo hormônio foliculo estimulante. Abreviações: LY: LY294002; Wo: wortmannin; Blastôm: blastômeros; Exp: duração da exposição ao inibidor durante a MIV; Dur: Duração da MIV. Similar: semelhante ao controle; Redução: estatisticamente inferior ao controle; Aumento: estatisticamente superior ao controle

Quatro experimentos adicionaram o inibidor LY durante a MIV de bovinos. Destes, dois avaliaram os efeitos sobre a retomada da meiose, apresentando efeitos negativos (ANAS *et al.*, 1998). Quando estudados os efeitos sobre a progressão à MII, três experimentos exibiram efeito positivo (ANAS *et al.*, 1998; DE SOUZA *et al.*, 2018) e, somente um, negativo (DE SOUZA *et al.*, 2018). As concentrações de 10⁻⁴ e 2,5 – 7,5 x 10⁻⁵ M do inibidor foram utilizadas em COCs e 2,5 – 7,5 x 10⁻⁵ M em DOs. Em todas as concentrações avaliadas, os efeitos sobre as taxas de retomada da meiose foram negativos, enquanto para a progressão à MII, a maioria das concentrações utilizadas foi capaz de gerar efeito positivo, com exceção de 2,5 x 10⁻⁵ M (ANAS *et al.*, 1998) e 10⁻⁴ M, quando cultivado sem a presença de FSH (DE SOUZA *et al.*, 2018). Dois experimentos analisaram os efeitos da adição de LY no meio de MIV sobre as taxas de desenvolvimento embrionário. A concentração de 10⁻⁴ M do inibidor foi capaz de reduzir as taxas de clivagem e blastocisto quando o meio de MIV foi suplementado com FSH. Entretanto, a mesma concentração, sem adição de FSH, resulta em taxas similares ao controle (DE SOUZA *et al.*, 2018).

Dos 11 experimentos que estudaram os efeitos de Wo sobre as taxas de retomada da meiose, todos apresentaram efeito negativo (ANAS *et al.*, 2000; ANAS *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2020). Já sobre a progressão à MII, 86% (6/7) foram categorizados como positivos, variando entre 10^{-8} e 10^{-6} M em COCs e DOs (ANAS *et al.*, 2000; ANAS *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2020). A única exceção foi quanto a adição de Wo durante a MIV de 28 h, que apresentou taxas similares ao controle (PEREIRA *et al.*, 2020). Taxas de pós-MIV foram analisadas em três experimentos, que utilizaram a concentração fixa de 2×10^{-8} M de Wo. A exposição ao inibidor por 10 min ou 6 h não alterou as taxas de clivagem e blastocisto. Entretanto, um aumento na taxa de blastocisto foi descrito no grupo exposto ao inibidor por 22 h (PEREIRA *et al.*, 2020).

A adição de SH6 durante a MIV foi estudada em dois experimentos, que somente avaliaram os efeitos sobre a taxa de progressão da meiose. Em ambos os experimentos, as taxas foram reduzidas com a adição do inibidor, caracterizando um efeito positivo (EL SHEIKH *et al.*, 2019; TOMEK E SMILJAKOVIC, 2005). As suplementações de $1 - 7,5 \times 10^{-5}$ M de SH6 foram exploradas nos experimentos incluídos. As concentrações de 5 e $7,5 \times 10^{-5}$ M foram capazes de inibir a progressão à MII, entretanto $2,5$ e 1×10^{-5} M resultaram em efeito negativo (EL SHEIKH *et al.*, 2019; TOMEK E SMILJAKOVIC, 2005). Somente um experimento analisou a adição de SH6 na qualidade e desenvolvimento embrionário. Adição de $2,5 \times 10^{-5}$ M não resultou em alteração na taxa de clivagem, entretanto as concentrações de 5 e $7,5 \times 10^{-5}$ M foram capazes de reduzir esta taxa de forma dose-dependente. Já as taxas de blastocisto, diminuíram de acordo com a dose aplicada, em todas as concentrações estudadas. Além disso, com a adição de 5×10^{-5} M, foi possível observar um aumento das taxas de apoptose, enquanto a taxa de blastômeros/embrião se reduziu (EL SHEIKH *et al.*, 2019).

4.1.3. Murinos

Três artigos avaliaram os efeitos dos inibidores da via PI3K/AKT/PTEN na MIV de murinos. A partir deles, 10 experimentos foram extraídos (Tabela 6).

Somente dois inibidores foram utilizados: LY (70%) e SH6 (30%). Não foram encontrados artigos que abordam análises pós-MIV.

Tabela 6. Lista de artigos e experimentos que avaliaram os efeitos da inibição da via PI3K/AKT/PTEN durante a maturação *in vitro* (MIV) sobre a retomada da meiose e/ou progressão à metáfase II de murinos.

Referência	Inibidor	COC/ DO	Dose (M)	Exp/ Dur. (h)	Meio de MIV (fonte proteica e hormônios)	Efeitos sobre*		
						Retomada	Progressão	
Hoshino <i>et al.</i> 2004	LY	COC	10 ⁻⁵	18	MB752/1; 5% FCS	Negativo	Negativo	
			10 ⁻⁴			Negativo	Negativo	
		DO	10 ⁻⁵	18	MB752/1; 5% FCS; Hx 4 mM; 100 IU/L FSH	Negativo	Positivo	
			10 ⁻⁴			Positivo	Positivo	
			10 ⁻⁵			Negativo	Negativo	
		10 ⁻⁴	Negativo	Negativo				
		10 ⁻⁵	Negativo	Positivo				
10 ⁻⁴	Negativo	Positivo						
Liu <i>et al.</i> 2019		DO	5 x 10 ⁻⁴	4	M2	Positivo	-	
			10 ⁻³			Positivo	-	
Saskova <i>et al.</i> 2008		DO	10 ⁻⁴	0,9	M16	Positivo	-	
			10 ⁻⁴	2		Positivo	-	
		SH6	DO	5 x 10 ⁻⁵	0,9	M16	Positivo	-
				5 x 10 ⁻⁵	2		Positivo	-
Liu <i>et al.</i> 2018		DO	10 ⁻⁶	4,5	M2	Negativo	-	
			10 ⁻⁵			Positivo	-	
			10 ⁻⁴			Positivo	-	

*O efeito positivo foi categorizado quando, com a adição do inibidor, foi possível observar a inibição das taxas, enquanto o efeito negativo foi considerado quando não há inibição. Abreviações: LY: LY294002; Wo: wortmannin; COC: complexo *cumulus*-oócito; DO: oócitos desnudos; Exp/Dur: Tempo de exposição ao inibidor durante a MIV e duração da MIV; FCS: soro fetal bovino; FSH: hormônio folículo estimulante; Hx: hipoxantina; FFMAS: esteroide ativador da meiose do fluido folicular.

O inibidor LY foi avaliado em sete experimentos. Destes, todos avaliaram a retomada da meiose, porém somente quatro, a progressão. Os efeitos sobre a taxa de GVBD foram caracterizados como positivos em 57% (4/7) dos experimentos. Já sobre a progressão à MII, 50% foram positivos. As concentrações do inibidor adicionadas durante a MIV variaram de 10⁻⁵ a x 10⁻³ M. Os experimentos que cultivaram COCs analisaram os efeitos somente de 10⁻⁵ e 10⁻⁴ M, com adição de FSH e Hx (MIV induzida) ou não (MIV espontânea). Em ambas as condições, a adição de 10⁻⁵ não foi capaz de inibir GVBD ou MII. Entretanto, a suplementação de 10⁻⁴ M de LY inibiu tanto a retomada quanto a progressão, quando induzida por FSH (HOSHINO *et al.*, 2004). Quando a MIV é

realizada em DOs, as concentrações de 5×10^{-4} e 10^{-3} M resultaram na inibição da retomada da meiose (LIU *et al.*, 2019), enquanto 10^{-5} M resultou em efeitos negativos (HOSHINO *et al.*, 2004). A suplementação de 10^{-4} M de LY durante a MIV resultou em dados contrastantes (HOSHINO *et al.*, 2004; SASKOVA *et al.*, 2008). Já a respeito da progressão da meiose, as concentrações de 10^{-5} e 10^{-4} M foram empregadas, apresentando efeitos positivos e negativos, dependendo da suplementação do meio (HOSHINO *et al.*, 2004).

Três experimentos avaliaram a suplementação de SH6 na MIV e somente a retomada da meiose foi avaliada, apresentando efeito positivo em todos. As concentrações utilizadas variaram de 10^{-6} a 10^{-4} M, somente estudadas em DOs. Com exceção de 10^{-6} M, todas as outras concentrações testadas (10^{-6} , 5 e 1×10^{-5} e 10^{-4} M) resultaram na inibição de GVBD (LIU *et al.*, 2018; SASKOVA *et al.*, 2008).

5. DISCUSSÃO

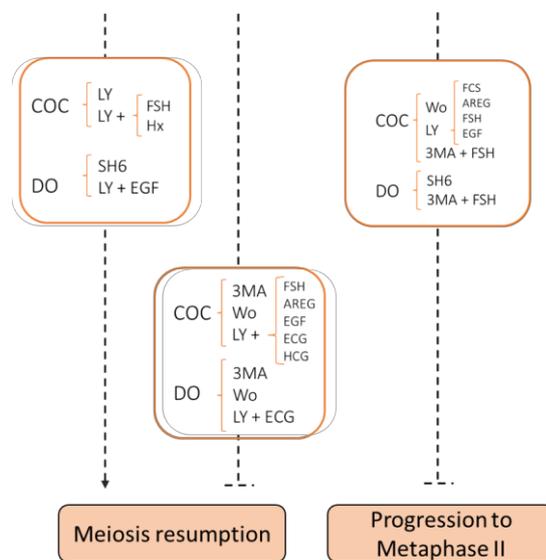
A via PI3K/AKT/PTEN, de forma geral, parece não regular a retomada e progressão da meiose em mamíferos de maneira homogênea. Foi possível observar que os resultados são dependentes majoritariamente da espécie estudada, seguidos do inibidor empregado e componentes do meio de MIV. Em sua maioria, os artigos incluídos nessa revisão sistemática objetivaram a inibição enzimática completa para entendimento básico do papel da via sobre a MIV. Entretanto, alguns exploraram estratégias para o bloqueio temporário ou atraso da retomada, o que demonstrou o potencial da modulação durante a MIV para melhoria da eficiência da produção de blastocistos.

A via PI3K/AKT/PTEN em suínos regula a expressão de genes relacionados à proliferação e sobrevivência (JIAO *et al.*, 2020; SHIMADA *et al.*, 2003), atividade mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SHEN *et al.*, 2018), além de estar envolvida na expansão das CCs (JIAO *et al.*, 2020; PARK *et al.*, 2011; PROCHAZKA *et al.*, 2012; SHIMADA *et al.*, 1998). A modulação da via não altera a viabilidade (PARK *et al.*, 2011) e pode ser dependente da classe morfológica dos oócitos (SONG *et al.*, 2018). O controle da retomada da meiose nesta espécie ainda não é bem definido, apresentando dados um pouco diferentes para cada modulador empregado, provavelmente de acordo com a molécula alvo de atuação de cada inibidor (Figura 1).

Com a suplementação dos inibidores 3MA e Wo ao meio de MIV de suínos, foi possível verificar que GVBD é dependente da via, agindo diretamente através do oócito (PARK *et al.*, 2011; SHIMADA *et al.*, 1998; SONG *et al.*, 2018). Entretanto, com a adição de LY ao meio básico de MIV, a via parece não ter papel central para retomada da meiose (SHIMADA E TERADA, 1999). Porém, a adição do inibidor estimula GVBD (LI *et al.*, 2008) e regula atividade de pAKT (SONG *et al.*, 2018), sendo dependente da ativação da via nas CCs, assim como a MIV induzida por anfirregulina (PROCHAZKA *et al.*, 2012). A MIV induzida por FSH parece ser dependente da ativação da via PI3K/AKT/PTEN (KALOUS *et al.*, 2009; SHIMADA *et al.*, 2003), porém dados encontrados por PROCHAZKA *et al.* (2012) divergem. É possível hipotetizar que a adição de soro fetal bovino (FCS) ao meio de MIV estimula a ativação da via ou que haja somente um atraso de GVBD nas

primeiras 24h, se igualando ao final das 44h. A Hipoxantina (Hx) também é relatada como um aditivo ao meio de MIV, sendo utilizada para manutenção de altos níveis de cAMP intraocitários (RAMOS LEAL *et al.*, 2018). Entretanto, o uso de Hx demonstrou promover a retomada da meiose com a adição de LY (SHIMADA *et al.*, 2003). DE SOUZA *et al.*, (2018) constatou que o inibidor estimulou a produção de progesterona, acarretando a retomada precoce da meiose devido à perda das *gap junctions*, principalmente a conexina-43 (SHIMADA *et al.*, 1999). Já com a adição de SH6, verificou-se que a retomada da meiose é acelerada, mas ao fim da MIV, as taxas são similares ao controle. Isto pode ter ocorrido devido a uma inibição paralela de PKA, compensando a inibição sobre AKT (KALOUS *et al.*, 2009). O controle da progressão da meiose é altamente regulado pela atividade de PI3K/AKT/PTEN, uma vez que todos os moduladores testados foram capazes de reduzir as taxas de MII. Ainda neste sentido, KALOUS *et al.*, (2009) demonstrou a importância de AKT para formação do fuso meiótico, já que quando inibida, todos os oócitos apresentaram fuso aberrante, bloqueando a transição MI/MII (Figura 3).

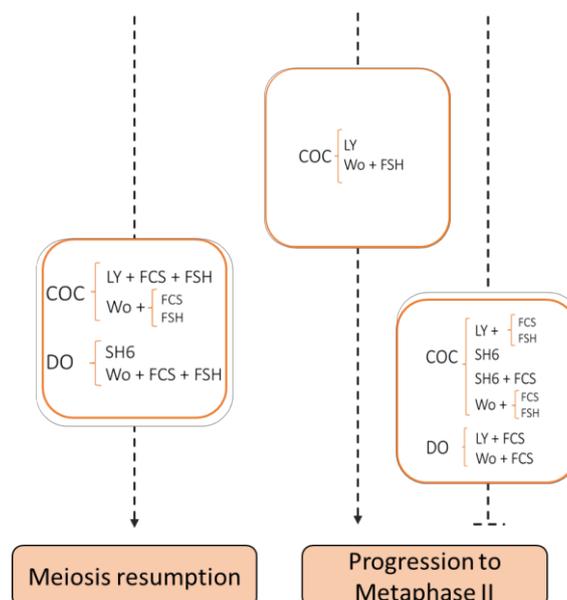
Figura 3: Resumo das evidências da inibição da via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase e tensina homóloga (PI3K/AKT/PTEN) durante a maturação *in vitro* de oócitos suínos. Considerando a suplementação de inibidores diretos de PI3K e AKT, com ou sem adição de hormônios e/ou fonte proteica, no meio de maturação *in vitro* de suínos, bovinos e murinos e seus efeitos na retomada e progressão da meiose. Abreviaturas: COC: complexo cumulus-oócito; DO: oócitos desnudos; FSH: hormônio folículo-estimulante; LY: LY294002; FCS: soro fetal bovino; FFMAS: esteroide ativador da meiose do fluido folicular.



Em bovinos, a via PI3K/AKT/PTEN atua sobre a proliferação e sobrevivência, maturação, atividade e distribuição das mitocôndrias, produção de ROS (EL SHEIKH *et al.*, 2019; TOMEK E SMILJAKOVIC, 2005). Além de regular a esteroidogênese, apoptose e expressão de receptores de LH e FSH nas CCs (DE SOUZA *et al.*, 2018). A expansão das CCs parece estar atrelada a atividade de AKT e não de PI3K, já que quando os inibidores LY e Wo foram adicionados, não foi possível observar alteração no padrão de expansão (ANAS *et al.*, 1998). Entretanto, quando SH6 foi adicionado, tanto os genes relacionados quanto a expansão foram inibidos (EL SHEIKH *et al.*, 2019). A modulação da via não acarreta alteração da viabilidade dos oócitos (PEREIRA *et al.*, 2020), nem na cinética de GVBD (ANAS *et al.*, 2000), demonstrando que a retomada parece não ser dependente de PI3K/AKT/PTEN. A inibição de outras enzimas relacionadas à via também foi avaliada, indicando que a modulação não altera a atividade da

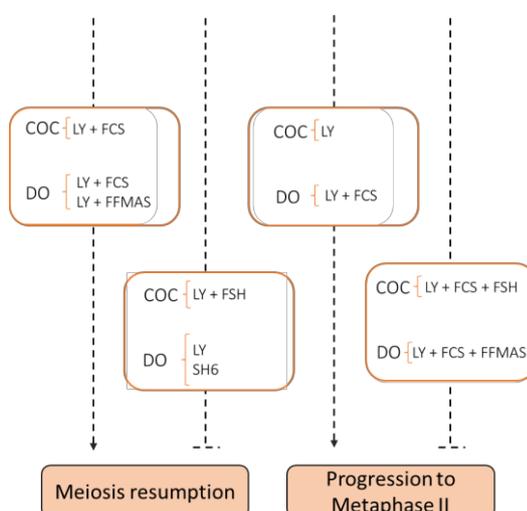
quinase ativada por mitógeno – MAPK (ANAS *et al.*, 2000; TOMEK E SMILJAKOVIC, 2005). Entretanto, quando Wo foi adicionado, a quinase dependente de ciclina (cdc2) manteve-se ativa, inibindo a transição MI/MII, sendo, portanto, dependente da redução da atividade dessa ciclina (ANAS *et al.*, 2000). O mesmo não ocorre com a inibição da via por SH6, que não alterou MPF (TOMEK E SMILJAKOVIC, 2005). Já a progressão à MII é dependente da ativação da via, mesmo quando o tempo de exposição ao inibidor é baixo (PEREIRA *et al.*, 2020). Essa regulação parece ocorrer diretamente através do oócito, uma vez que o cultivo tanto de COCs quanto de DOs apresenta dados consoantes. A inibição verificada com o uso de SH6 e Wo se mostrou reversível e, quando o tempo de MIV é estendido, as taxas de MII são similares ao controle (PEREIRA *et al.*, 2020; TOMEK E SMILJAKOVIC, 2005) (Figura 4).

Figura 4: Resumo das evidências da inibição da via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase e tensina homóloga (PI3K/AKT/PTEN) durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Considerando a suplementação de inibidores diretos de PI3K e AKT, com ou sem adição de hormônios e/ou fonte proteica e seus efeitos na retomada e progressão da meiose. Abreviaturas: COC: complexo cumulus-oócito; DO: oócitos desnudos; FSH: hormônio folículo-estimulante; LY: LY294002; FCS: soro fetal bovino; FFMAS: esterol ativador da meiose do fluido folicular.



A via PI3K/AKT/PTEN em murinos parece apresentar alto controle sobre a retomada da meiose em meio básico (LIU *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019; SASKOVA *et al.*, 2008) e durante a MIV induzida por FSH (HOSHINO *et al.*, 2004). Já a MIV induzida por FF-MAS em DOs demonstrou que a via é dependente das CCs durante a retomada, mas para progressão, a via age diretamente sobre o oócito. Entretanto, a MIV espontânea suplementada por FCS promove a retomada e progressão à MII (HOSHINO *et al.*, 2004), uma vez que o soro é composto por moléculas, como EGF e insulina (ANAS *et al.*, 1998), que são promotores eficientes da via PI3K/AKT/PTEN (CECCONI *et al.*, 2012). A expansão das CCs parece ser regulada pela via durante a MIV induzida por FSH (HOSHINO *et al.*, 2004). Além disso, o uso de SH6 reduziu níveis de pAKT e levou ao padrão aberrante de distribuição dessa quinase, cdc2 e alfa-tubulina no oócito (HOSHINO *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2018) (Figura 5).

Figura 5: Resumo das evidências da inibição da via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase e tensina homóloga (PI3K/AKT/PTEN) durante a maturação *in vitro* de oócitos murinos. Considerando a suplementação de inibidores diretos de PI3K e AKT, com ou sem adição de hormônios e/ou fonte proteica, no meio de maturação *in vitro* de suínos, bovinos e murinos e seus efeitos na retomada e progressão da meiose. Abreviaturas: COC: complexo cumulus-oócito; DO: oócitos desnudos; FSH: hormônio folículo-estimulante; LY: LY294002; FCS: soro fetal bovino; FFMAS: esteroide ativador da meiose do fluido folicular.

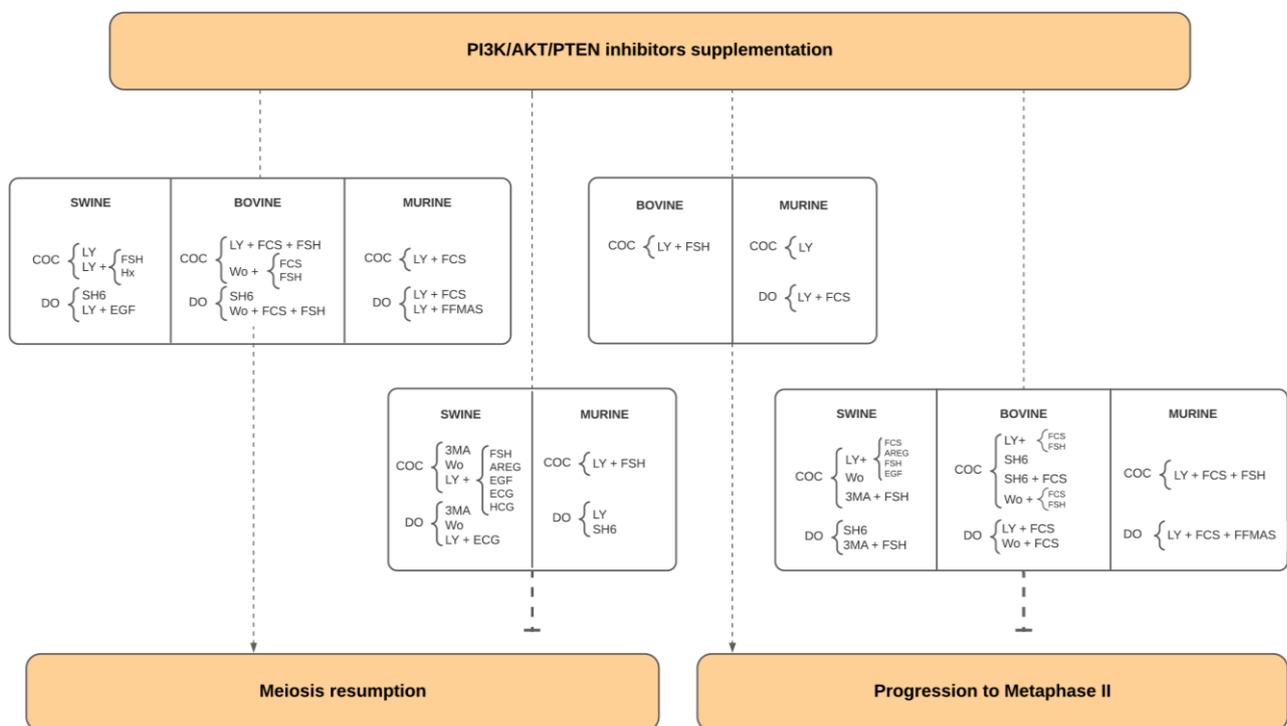


Uma grande barreira para a eficiência da PIVE ainda é decorrente da baixa qualidade da MIV, uma vez que a retirada dos COCs do ambiente folicular promove redução de nucleotídeos cíclicos, retomando a meiose de forma prematura, acarretando a dessincronização das maturações nuclear e citoplasmática. Alguns moduladores como cilostamide, IBMX e forskolina já foram estudados a fim de manter os níveis de cAMP elevados, resultando em maior produção de blastocistos (RAMOS LEAL *et al.*, 2018). Da mesma forma, a via PI3K/AKT/PTEN possui grande potencial para melhoria da eficiência da PIVE (PEREIRA *et al.*, 2020), entretanto, ainda é pouco estudada para esse fim. Estudos que focaram somente na reversibilidade da inibição, demonstraram que a adição do modulador no início da maturação, seguido de MIV em meio sem inibidor, iguala as taxas de MII ao controle (PARK *et al.*, 2011; SHIMADA *et al.*, 1998; TOMEK E SMILJAKOVIC, 2005), com exceção de SONG *et al.* (2018). Essa única diferença parece ser dependente da concentração utilizada de Wo ($10^{-5} - 5 \times 10^{-6}$ M), que provavelmente acarreta a inibição irreversível de todas as classes de PI3K, que não foi verificada em PEREIRA *et al.*, (2020), que ao adicionar 2×10^{-8} M, reduziu a atividade da PI3K em 30%, de forma reversível.

O papel da via PI3K/AKT/PTEN durante a MIV se torna mais explícito quando os impactos de sua inibição são visualizados sobre a produção de blastocistos. A maioria dos artigos demonstra que a inibição direta da via acarreta menor eficiência da CIV. As exceções são PARK *et al.* (2011) e PEREIRA *et al.* (2020), que objetivaram o bloqueio temporário da retomada e redução da atividade da PI3K, respectivamente, resultando em taxas iguais e até superiores ao controle. Isso ressalta o potencial da modulação da via para sincronização das maturações nuclear e citoplasmática (PEREIRA *et al.*, 2020; SHIMADA *et al.*, 1998), reduzindo, portanto, os efeitos negativos da remoção dos COCs do ambiente folicular, sendo uma possível estratégia para melhoria da eficiência geral da PIVE.

Figura 6: Resumo das evidências debatidas nos artigos incluídos da revisão sistemática sobre a modulação da via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B/fosfatase e tensina homóloga (PI3K/AKT/PTEN) durante a maturação *in vitro* de

oócitos de mamíferos. Considerando a suplementação de inibidores diretos de PI3K e AKT, com ou sem adição de hormônios e/ou fonte proteica, no meio de maturação *in vitro* de suínos, bovinos e murinos e seus efeitos na retomada e progressão da meiose. Abreviaturas: COC: complexo cumulus-oócito; DO: oócitos desnudos; FSH: hormônio folículo-estimulante; Wo: wortmannin; LY: LY294002; 3MA: 3-metiladenina EGF: fator de crescimento epidérmico; FCS: soro fetal bovino; ECG: gonadotrofina coriônica equina; HCG: gonadotrofina coriônica humana; Hx: hipoxantina; AREG: anfirregulina; FFMAS: esterol ativador da meiose do fluido folicular.



Uma importante limitação desta revisão se dá pela fonte do oócito, que, com exceção de estudos em murinos, que geralmente possuem informações sobre o animal e um ambiente controlado, em bovinos e suínos os oócitos são provenientes de abatedouro, portanto, não há controle de cada indivíduo, sua alimentação, idade ou saúde. Além disso, como a revisão baseou-se unicamente na análise estatística de cada artigo, não foi possível inferir outras informações, como por exemplo inibição de GVBD quando somente eram apresentados dados

de MII ou o contrário. Somado a isto, as diferentes condições de cultivo em cada artigo dificultam o a extrapolação do real papel do inibidor. Contudo, apesar dessas limitações, as informações extraídas dos estudos possibilitam o melhor entendimento geral sobre a via dentre as espécies de mamíferos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1. CONCLUSÕES

A via PI3K/AKT/PTEN tem papel crucial para proliferação, sobrevivência, formação do fuso meiótico, distribuição de proteínas pelo citoplasma, regulação da atividade mitocondrial, produção de ROS e expansão das CCs. Entretanto, não regula a retomada e progressão da meiose da mesma forma nos diferentes grupos de mamíferos. Em suínos, a progressão à MII é altamente regulada pela via, porém, GVBD apresenta controle diferenciado dependendo do inibidor. Em bovinos, a retomada é independente e a progressão, dependente da atividade de PI3K/AKT/PTEN. Já em murinos, a via controla a retomada se não há suplementação de ativadores da via, enquanto a progressão é independente da via quando não induzida por gonadotrofinas. Além disso, reduzir a atividade da via ou inibir temporariamente a meiose durante a MIV podem ser estratégias para aumentar a eficiência da produção de blastocistos.

6.2. PERSPECTIVAS

Ainda é necessário que mais estudos analisem o papel da via sobre a retomada da meiose em mamíferos, pois grande parte dos estudos ainda são contrastantes e se confundem dependendo da composição do meio de MIV. Portanto, é preciso que sejam entendidos os efeitos desses componentes e os possíveis efeitos sinérgicos ou antagonistas deles sobre a adição dos moduladores. Além disso, são poucos grupos que seguem até a produção de blastocisto e que avaliam a qualidade destes, sendo necessários mais estudos para melhor aprofundamento no tema.

Uma vez melhor entendidos os mecanismos que regulam a retomada e progressão da meiose, possivelmente será possível traçar um padrão de atuação

da via em mamíferos e entender as particularidades dos grupos de mamíferos, podendo proporcionar a expansão do conhecimento a outras espécies. Assim, a modulação da via PI3K/AKT/PTEN pode ser uma poderosa ferramenta para melhor sincronização das maturações e conseqüente maior eficiência da produção de blastocistos, sendo uma possível estratégia para o aumento da fertilidade em casais e conservação de animais ameaçados de extinção e a maximização da produção de embriões para o agronegócio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, J. PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors: The ideal combination partners for breast cancer therapies? *Expert Review of Anticancer Therapy*, v. 15, n. 1, p. 51–68, 2014.

Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews*, v. 30, n. 5, p. 438–464, 2009.

Anas MKI, Shimada M, Terada T. Possible role for phosphatidylinositol 3-kinase in regulating meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*, v. 50, n. 3, p. 347–356, 1998.

Anas MKI, 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, n. 9, p. 1797–1806, 2000.

Andersen CB, Sakaue H, Nedachi T, Kovacina KS, Clayberger C, Conti M, Roth RA. Protein kinase B/Akt is essential for the insulin- but not progesterone-stimulated resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Biochemical Journal*, v. 369, n. 2, p. 227–238, 2003.

Ashry M, Rajput SK, Folger JK, Knott JG, Hemeida NA, Kandil OM, Ragab RS, Smith GW. Functional role of AKT signaling in bovine early embryonic development: potential link to embryotrophic actions of follistatin. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 16, n. 1, 2018.

Blunt MD, Steele AJ. Pharmacological targeting of PI3K isoforms as a therapeutic strategy in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia Research Reports*, v. 4, n. 2, p. 60–63, 2015.

Brevini Gandolfi TAL, Gandolfi F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, v. 55, n. 6, p. 1255–1276, 2001.

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, v. 296, n. 5573, p.

1655–1657, 2002.

Carnero A, Lacal JC. Wortmannin, an inhibitor of phosphatidyl-inositol 3-kinase, induces oocyte maturation through a MPF-MAPK-dependent pathway. *FEBS Letters*, v. 422, n. 2, p. 155–159, 1998.

Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN–PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*, v. 27, n. 41, p. 5527–5541, 2008.

Cecconi S, Mauro A, Cellini V, Patacchiola, F. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *International Journal of Developmental Biology*, v. 56, n. 10–12, p. 809–817, 2012.

Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, n. 10, p. 769–776, 2001.

Comizzoli P, Pukazhenthil BS, Wildt DE. The competence of germinal vesicle oocytes is unrelated to nuclear chromatin configuration and strictly depends on cytoplasmic quantity and quality in the cat model. *Human Reproduction*, v. 26, n. 8, p. 2165–2177, 2011.

Conti M, Franciosi F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: Integrated nuclear and cytoplasmic events. *Human Reproduction Update*, v. 24, n. 3, p. 245–266, 2018.

Das D, Nath P, Pal S, Hajra S, Ghosh P, Maitra S. Relative importance of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt and mitogen-activated protein kinase (MAPK3/1) signaling during maturational steroid-induced meiotic G2-M1 transition in zebrafish oocytes. *Zygote*, v. 26, n. 1, p. 62–75, 2018.

de Souza DK, Salles LP, Camargo R, Gulart LVM, Costa E Silva S, de Lima, BD, Torres FAG, Rosa E Silva AAM. Effects of PI3K and FSH on steroidogenesis, viability and embryo development of the cumulus-oocyte complex after in vitro culture. *Zygote*, v. 26, n. 1, p. 50–61, 2018.

Dekel, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 234, n. 1–2, p. 19–25, 2005.

Dorée M, Hunt T. From Cdc2 to Cdk1: When did the cell cycle kinase join its cyclin

partner? *Journal of Cell Science*, v. 115, n. 12, p. 2461–2464, 2002.

Duggavathi R, Murphy BD. Ovulation signals. *Science*, v. 324, n. 5929, p. 890–891, 2009.

Dunning KR, Robker RL. The role of l-carnitine during oocyte in vitro maturation: Essential co-factor? *Animal Reproduction*, v. 14, n. 3, p. 469–475, 2017.

El-Hayek S, Clarke HJ. Follicle-Stimulating Hormone Increases Gap Junctional Communication Between Somatic and Germ-Line Follicular Compartments During Murine Oogenesis¹. *Biology of Reproduction*, v. 93, n. 2, p. 1–10, 2015.

El Sheikh M, Mesalam A, Mesalam AA, Idrees M, Lee KL, Kong IK. Melatonin Abrogates the Anti-Developmental Effect of the AKT Inhibitor SH6 in Bovine Oocytes and Embryos. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 12, p. 2956, 2019.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, v. 7, n. 8, p. 606–619, 2006.

Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 8, n. 4, p. 485–489, 1996.

Fair T. Molecular and endocrine determinants of oocyte competence. *Animal Reproduction*, v. 10, n. 3, p. 277–282, 2013.

Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, v. 14, n. 5, p. 991–1004, 2020.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v. 71, n. 5, p. 836–848, 2009.

Gharbi SI, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ, Hancox T, Saghir N, Timms JF, Waterfield MD. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochemical Journal*, v. 404, n. 1, p. 15–21, 2007.

Gilchrist RB, Lane M, Thompson, JG. Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, v. 14, n. 2, p. 159–177, 2008.

Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, de Vos M, Sugimura S, Smitz J, Richard FJ, Thompson JG. Oocyte maturation and quality: Role of cyclic nucleotides. *Reproduction*, v. 152, n. 5, p. 143–157, 2016.

Gilchrist, RB, Thompson, JG. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology*, v. 67, n. 1, p. 6–15, 2007.

Grive KJ, Freiman RN. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development*, v. 142, n. 15, p. 2554–2563, 2015.

Hennet ML, Combelles CMH. The antral follicle: A microenvironment for oocyte differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, v. 56, n. 10–12, p. 819–831, 2012.

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, n. 1, p. 77–86, 2004.

Ikami K, Nuzhat N, Lei L. Organelle transport during mouse oocyte differentiation in germline cysts. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 44, p. 14–19, 2017.

Jiao Y, Li J, Zhu S, Ahmed JZ, Li M, Shi D, Huang B. PI3K inhibitor reduces in vitro maturation and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*, v. 157, p. 432–439, 2020.

Jongsma MLM, Berlin I, Neefjes J. On the move: Organelle dynamics during mitosis. *Trends in Cell Biology*, v. 25, n. 3, p. 112–124, 2015.

Kalous J, Kubelka M, Solc P, Susor A, Motlík J. AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. *Reproduction*, v. 138, n. 4, p. 645–654, 2009.

Kalous J, Solc P, Baran V, Kubelka M, Schultz RM, Motlik J. PKB/AKT is involved

in resumption of meiosis in mouse oocytes. *Biology of the Cell*, v. 98, n. 2, p. 111–123, 2006.

Kane MTA. review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. *Animal Reproduction Science*, v. 79, n. 3–4, p. 171–190, 2003.

Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *Journal of animal science*, v. 82 E-Suppl, p. 14–23, 2004.

Li M, Liang CG, Xiong B, Xu BZ, Lin SL, Hou Y, Chen DY, Schatten H, Sun QY. PI3-kinase and mitogen-activated protein kinase in cumulus cells mediate EGF-induced meiotic resumption of porcine oocyte. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 34, n. 4, p. 360–371, 2008.

Li R, Albertini DF. The road to maturation: Somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 14, n. 3, p. 141–152, 2013.

Liu L, Li H, Labbe B, Wang Y, Mao S, Cao Y, Zhao M, Liu S, Yu H, Deng X. Involvement of CaMKII in regulating the release of diplotene-arrested mouse oocytes by pAkt1 (Ser473). *Cell Cycle*, v. 18, n. 21, p. 2986–2997, 2019.

Liu L, Li S, Li H, Yu D, Li C, Li G, Cao Y, Feng C, Deng X. Protein kinase C δ (PKC δ) involved in the regulation of pAkt1 (Ser473) on the release of mouse oocytes from diplotene arrest. *Cell Biochemistry and Function*, v. 36, n. 4, p. 221–227, 2018.

Liu L, Rajareddy S, Reddy P, Jagarlamudi K, Du C, Shen Y, Guo Y, Boman K, Lundin E, Ottander U, Selstam G, Liu K. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase-3 by soluble kit ligand in mouse oocytes during early follicular development. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 38, n. 1–2, p. 137–146, 2007.

Loidl J. Conservation and Variability of Meiosis Across the Eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, v. 50, n. 1, p. 293–316, 2016.

Lonergan P, Fair T. Maturation of Oocytes in Vitro. *Annual Review of Animal*

Biosciences, v. 4, n. 1, p. 255–268, 2016.

Macgregor IA, Adams IR, Gilbert N. Large-scale chromatin organisation in interphase, mitosis and meiosis. *Biochemical Journal*, v. 476, n. 15, p. 2141–2156, 2019.

Makker A, Goel MM, Mahdi AA. PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: an update. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 53, n. 3, p. 103–118, 2014.

Marston AL, Amon A. Meiosis: Cell-cycle controls shuffle and deal. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 5, n. 12, p. 983–997, 2004.

Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. *Science*, v. 296, n. 5576, p. 2178–2180, 2002.

Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, v. 130, n. 6, p. 791–799, 2005.

Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*, v. 14, n. 5, p. 381–395, 2002.

Niederberger, C. et al. Forty years of IVF. *Fertility and Sterility*, v. 110, n. 2, p. 185–324, 2018.

Novak B, Csikasz-Nagy A, Gyorffy B, Chen K, Tyson JJ. Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions. *Biophysical Chemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 185–200, 1998.

Oh JS, Han SJ, Conti M. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *Journal of Cell Biology*, v. 188, n. 2, p. 199–207, 2010.

Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan---a web and mobile app for systematic reviews. *Systematic Reviews*, v. 5, n. 1, p. 210, 2016.

Park MR, Gupta MK, Lee HR, Das ZC, Uhm SJ, Lee HT. Possible involvement of Class III phosphatidylinositol-3-kinase in meiotic progression of porcine oocytes beyond germinal vesicle stage. *Theriogenology*, v. 75, n. 5, p. 940–950, 2011.

Pereira JL, Curcio AG, Barroso LM, Mogollón-Waltero EM, Gomes HF, Maia RC, Viana KS, Caldas Bussiere MC, Marin DFD, Dias AJB. Modulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity during in vitro oocyte maturation increases the production of bovine blastocysts. *Zygote*, v. 28, n. 5, p. 371–376, 2020.

Prochazka R, Blaha M, Nemcova L. Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction*, v. 144, n. 5, p. 535–546, 2012.

Ramos Leal G, Santos Monteiro CA, Souza-Fabjan, JMG, de Paula Vasconcelos CO, Garcia Nogueira LA, Reis Ferreira AM, Varella Serapião R. Role of cAMP modulator supplementations during oocyte in vitro maturation in domestic animals. *Animal Reproduction Science*, v. 199, p. 1–14, 2018.

Sartori R, Prata AB, Figueiredo ACS, Sanches BV, Pontes GCS, Viana JHM, Pontes JH, Vasconcelos JLM, Pereira MHC, Dode MAN, Monteiro PLJ, Baruselli PS. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. *Animal Reproduction*, v. 13, n. 3, p. 300–312, 2016.

Saskova A, Solc P, Baran V, Kubelka M, Schultz RM, Motlik J. Aurora kinase a controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Cell Cycle*, v. 7, n. 15, p. 2368–2376, 2008.

Schafer KA. The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology*, v. 35, n. 6, p. 461–478, 1998.

Schmitt A, Nebreda AR. Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *Journal of Cell Science*, v. 115, n. 12, p. 2457–2459, 2002.

Shen XH, Jin YX, Liang S, Kwon JW, Zhu JW, Lei L, Kim NH. Autophagy is required for proper meiosis of porcine oocytes maturing in vitro. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, 2018.

Shimada M, Anas, MKI, Terada, T. Effects of phosphatidylinositol 3-kinase

inhibitors, wortmannin and LY294002, on germinal vesicle breakdown (GVBD) in porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, v. 44, n. 3, p. 281–288, 1998.

Shimada M, Ito J, Yamashita Y, Okazaki T, Isobe N. Phosphatidylinositol 3-kinase in cumulus cells is responsible for both suppression of spontaneous maturation and induction of gonadotropin-stimulated maturation of porcine oocytes. *Journal of Endocrinology*, v. 179, n. 1, p. 25–34, 2003.

Shimada M, Terada T. Phosphorylation of Connexin-43, Gap Junctional Protein, in Cumulus Cells is Regulated by Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase during In Vitro Meiotic Resumption in Porcine Follicular Oocytes. *Journal of Mammalian Ova Research*, v. 16, n. 1, p. 37–42, 1999.

Shimohama S. Nicotinic receptor-mediated neuroprotection in neurodegenerative disease models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 32, n. 3, p. 332–336, 2009.

Shuhaibar LC, Egbert JR, Norris RP, Lampe PD, Nikolaev VO, Thunemann M, Wen L, Feil R, Jaffe LA. Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 17, p. 5527–5532, 2015.

Silkworth WT, Cimini D. Transient defects of mitotic spindle geometry and chromosome segregation errors. *Cell Division*, v. 7, n. 1, p. 1, 2012.

Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006.

Sjunnesson Y. In vitro fertilisation in domestic mammals—a brief overview. *Upsala Journal of Medical Sciences*, v. 125, n. 2, p. 68–76, 2020.

Smith JA. Pathway Modulators and Inhibitors. *Current Protocols in Molecular Biology*, v. 92, n. 1, p. 6, 2010.

Song BS, Jeong PS, Lee JH, Lee MH, Yang HJ, Choi SA, Lee HY, Yoon SB; Park

YH, Jeong KJ, Kim YH, Jin YB, Kim JS, Sim BW, Huh JW, Lee SR, Koo DB, Chang KT, Kim SU. The effects of kinase modulation on in vitro maturation according to different cumulus oocyte complex morphologies. *PLoS ONE*, v. 13, n. 10, p. 1–20, 2018.

Tomek W, Smiljakovic T. Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. *Reproduction*, v. 130, n. 4, p. 423–430, 2005.

Van Den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v. 63, n. 6, p. 1717–1751, 2005.

Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera, M, Bilanges, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 11, n. 5, p. 329–341, 2010.

Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, Williams RL. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Molecular Cell*, v. 6, n. 4, p. 909–919, 2000.

Wang LQ, Liu JC, Chen CL, Cheng SF, Sun XF, Zhao Y, Yin S, Hou ZM, Pan B, Ding C, Shen W, Zhang XF. Regulation of primordial follicle recruitment by cross-talk between the Notch and phosphatase and tensin homologue (PTEN)/AKT pathways. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 6, p. 700–712, 2016.

Wigglesworth K, Lee KB, Emori C, Sugiura K, Eppig JJ. Transcriptomic Diversification of Developing Cumulus and Mural Granulosa Cells in Mouse Ovarian Follicles. *Biology of Reproduction*, v. 92, n. 1, p. 1–14, 2015.

Yamada M, Isaji Y. Structural and functional changes linked to, and factors promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. *Reproductive Medicine and Biology*, v. 10, n. 2, p. 69–79, 2011.

Yuan Y, Spate LD, Redel BK, Tian Y, Zhou J, Prather RS, Roberts RM. Quadrupling efficiency in production of genetically modified pigs through improved oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n.

29, p. E5796–E5804, 2017.

Zelevnik AJ. The physiology of follicle selection. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 2, p. 1–7, 2004.

Zheng W, Nagaraju G, Liu Z, Liu K. Molecular and Cellular Endocrinology Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 356, n. 1–2, p. 24–30, 2012.