CAMILA BRUNA DE LIMA

A relação entre a cinética de clivagem e a resposta metabólica de embriões bovinos submetidos à condições estressoras durante o cultivo *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

SÃO PAULO

2018

CAMILA BRUNA DE LIMA

**A relação entre a cinética de clivagem e a resposta metabólica de embriões
bovinos submetidos a condições estressantes durante o cultivo *in vitro*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas
Tecnológicas para obtenção do título de Doutora em
Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcella Pecora Milazzotto

Versão Original.

SÃO PAULO

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Lima, Camila Bruna

A relação entre a cinética de clivagem e a
resposta metabólica de embriões bovinos submetidos à
condições estressoras durante o cultivo in vitro /
Camila Bruna de Lima; orientador Marcella Pecora
Milazzotto. -- São Paulo, 2018.

118 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Embriões. 2. Bovinos. 3. Morfocinética. 4.
Metabolismo. I. Pecora Milazzotto, Marcella,
orientador. II. Título.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Fundação Universidade Federal do ABC

Comissão de Ética em Uso de Animais

Rua Catequese, 242, 8º andar · Bairro Jardim · Santo André - SP

CEP 09090-400 · Fone: (11) 4437.8424

ceua@ufabc.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado: “Metabolômica para avaliação não invasiva de embriões bovinos produzidos *in vitro*”, protocolado sob o nº 008/2014, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Marcella Pecora Milazzotto está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética em uso de animais” da Universidade Federal do ABC e foi aprovado em reunião de 18 de dezembro de 2014.

We certify that the research “Metabolomics for non-invasive evaluation of in vitro produced bovine embryo”, protocol number 008/2014, under the responsibility Profa. Dra. Marcella Pecora Milazzotto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of Universidade Federal do ABC and was approved in the meeting of day December 18, 2014.

Santo André-SP, 09 de janeiro de 2015.

Profa. Dra. Renata Simões
Coordenadora da CEUA - UFABC

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Camila Bruna de Lima

Título da Tese: A relação entre a cinética de clivagem e a resposta metabólica de embriões bovinos submetidos a condições estressantes durante o cultivo *in vitro*.

Orientador(a): Profa. Dra. Marcella Pecora Milazzotto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Dedico este trabalho aos meus pais e minha irmã, que são meu porto seguro e meu trampolim.

Aos meus avós Zita e Paulo que não medem esforços pela minha felicidade.

AGRADECIMENTOS

Neste momento de reflexão e gratidão, assim como estou compartilhando nesta tese os aprendizados dos últimos 4 anos de doutorado, também quero aproveitar para compartilhar alguns breves aprendizados destes últimos anos de vida e agradecer a pessoas importantes que estiveram ao meu lado.

Começo dizendo que sou uma dessas que acreditava que as pessoas não se tornam cientistas, elas nascem cientistas. Não consigo imaginar falar sobre terminar meu doutorado sem falar de como eu era “a pequena cientista da família” desde muito nova e de como meus pais foram peças fundamentais para que eu passasse de criança curiosa a mulher determinada a fazer ciência. A culpa é deles, falo isso sem medo. Porque foram eles que me deixaram brincar de ser o que eu quisesse ser, me incentivaram e apostaram todas as fichas em mim sem titubear. Mas muito mais do que isso, foram eles que me responderam “o que era a fotossíntese” quando eu perguntei; e que me deram o livro “De onde viemos?” para estudar quando a pergunta de como os bebês nascem era muito difícil de responder. E eles acreditaram na minha capacidade quando outros diziam que eu era muito nova para acompanhar o raciocínio dos mais velhos. Foram eles que me presentearam com um microscópio de brinquedo e com um joguinho de fazer reações químicas. E foram eles também que me deixaram ser fã de Sandy e Junior, mas também do Biólogo Sérgio Rangel que vinha todas as manhãs contar coisas sobre a natureza no imperdível Programa da Eliana.

Não tenho certeza se eles sabiam o que estavam fazendo na época em que tudo isso aconteceu, mas hoje quando avalio os resultados, concluo sem sombra de dúvida, que nasci cientista sim, mas que jamais me tornaria uma sem todo o amor, cuidado, incentivo e respeito dos meus pais, que até hoje me olham com alegria e o coração explodindo de orgulho cada vez que digo que meu trabalho foi aceito naquele congresso. Sentimento de gratidão eterna a estas duas pessoas que me deram raízes fortes, que me mostram todos os dias o valor da família e o poder transformador do amor. Gratidão por me darem asas, e também um lugar para voltar.

Outra coisa que meus pais me deram? Uma irmã! A melhor de todas, minha parceira, minha pirralha e que atende pelo nome de Karine quando não está sendo um anjo na minha vida. Ela diz que sou sua super heroína, mas a verdade é que eu boto minha capa e faço pose só pra fazê-la sorrir. De coração, obrigada a ela e ao João por serem tanto pra mim.

E não posso deixar de aproveitar a oportunidade para falar um pouco sobre pessoas com quais eu tenho o privilégio de compartilhar a vida.

Gui, meu companheiro de vida, minha fonte inesgotável de otimismo e incansável positividade. Dono do riso fácil e de uma força interior admirável. Quem diria né? É a frase que mais falamos até hoje. Do amigo de longa data, a meu amante, confidente e maior fã. Não digo que seria impossível passar por este processo sem ele, mas com certeza tudo ficou mais leve desde que ele reencontrou um espaço em minha vida. Agradeço por me escolher todos os dias, mas acima de tudo, agradeço pelo respeito e compreensão. Por aceitar minhas escolhas e apostar em mim e em nós. Ah, que sorte a do meu sorriso de ter você como motivo.

Minha orientadora, Marcella. Pensei por um bom tempo em como seria este momento e em tudo que eu gostaria de deixar registrado. E o que primeiro vem à mente é o “brilho no olho”. Eu tinha perdido este brilho quando me vi sentada na frente dela pela primeira vez. Estava desacreditada e desesperançosa da vida acadêmica, mas de repente, tudo mudou. Quatro anos de correrias, histórias e loucuras, mas afinal, foram quantos doutorados em um? E felizes foram os momentos em que sentei ao seu lado para “namorarmos os dados” e saí da sua sala com uma bagagem muito maior do que a que entrei. E não estou falando apenas de conhecimento científico, mas principalmente de amor pelo saber, de vontade de ser mais, de não me acomodar, não ter medo do incerto, não desanimar, e se desanimar, continuar assim mesmo. Muito mais do que uma relação de orientadora e aluna, temos uma parceria que eu espero levar pela vida. Então agradeço do fundo meu coração por ter me contagiado novamente com seu brilho no olhar, por ter acreditado em mim e me feito sentir corajosa, por ter ficado ao meu lado sofrendo e celebrando comigo, por ser uma mulher forte e determinada que me inspira todos os dias.

Mas nada do que está escrito nas páginas desta tese faria sentido sem aqueles que estavam lá dia após dia na nossa tentativa de rotina de laboratório (rotina? Que rotina?). Nada teria sido tão divertido sem as intermináveis horas de conversas com Érika na sala de cultura (dizem que era para estar preparando os meios), sem a nossa playlist especial da PIV (embriões gostam de música sertaneja!) e as nossas aventuras mais malucas por este mundo afora. Com certeza também não seria a mesma coisa sem a paz contagiante da Jéssica e nossos brainstormings científicos, ou sem cada minuto do café (forte, por favor!) com a May e cada história mirabolante da Carol que nos fez gargalhar até doer a barriga. Cada um com seu jeitinho, Kelly, Giunior, Karine, Otávio, Wellington, Giulia, os que passaram e foram embora, todos foram fundamentais para manter o laboratório funcionando e para manter um clima de alegria e companheirismo que não é fácil de encontrar por aí.

Além disso, neste caminho longo da carreira acadêmica, tive o prazer de cruzar com pessoas incríveis que deixaram de ser apenas colegas de profissão e se tornaram imprescindíveis e para as quais eu gostaria de deixar meus mais sinceros agradecimentos.

Peks, minha gêmea: não tem tempo que passe ou oceano atlântico que seja capaz de diminuir a intensidade deste encontro de almas. Obrigada! Simples assim, porque palavras nunca serão suficientes.

Sê, muito mais do que uma amiga para as horas, este trabalho não teria sido realizado sem toda a sua ajuda com a parte experimental do Biomark. É uma delícia podermos compartilhar a vida e a profissão, assim colecionamos momentos e histórias, mas também um monte de artigos publicados!!

Meninas da Rep. Mash: fomos do fricassê de frango ao filé mignon, da Terra do Saci (Botucatu) para o mundo, de “apenas” dividir contas a ter uma segunda família de verdade. Obrigada por torcerem tanto por mim, amo vocês!

Mits e Rê, Kk, Zulu e Marcos, o mundo não teria a menor graça sem vocês neles. Muito obrigada por caminharem ao meu lado.

Agradeço também à Universidade de São Paulo e aos funcionários do programa de Biotecnologia que nos ajudaram ao longo dos últimos 4 anos.

Aos professores Marcelo Nogueira, Christina Ferreira e Graham R. Cooks por me receberem em seus laboratórios e contribuírem tanto para a parte experimental do meu projeto, como para a minha formação pessoal.

À Universidade Federal do ABC, por nos oferecer uma segunda casa com toda a sua ótima infraestrutura e visão de futuro. E aos professores Marcela Sorelli e Marcelo Christoffolete, por todo o apoio dentro e fora do laboratório.

Finalmente, agradeço pelo apoio financeiro da FAPESP (2015/03381-0 e 2017/18384-0) e da Capes para realização do meu projeto tanto no país quanto no exterior.

“Your assumptions are your windows on the world. Scrub them off every once in a while, or
the light won't come in.”

— Isaac Asimov

RESUMO

DE LIMA, CB. **A relação entre a cinética de clivagem e a resposta metabólica de embriões bovinos submetidos a condições estressantes durante o cultivo *in vitro*.** 2018. 118 folhas. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Durante o cultivo *in vitro*, as células são submetidas a uma série de estímulos estressores e em geral, a heterogeneidade da resposta a estes estímulos não é levada em consideração. O presente estudo foi baseado em um modelo fatorial (2x2x3) criado para avaliar como embriões com cinética de desenvolvimento distinta respondem à combinação de estresse ambiental e metabólico durante o cultivo *in vitro*. Para isso, embriões rápidos (4 ou mais células às 22 horas de cultura) e Lentos (2 ou 3 células) foram produzidos *in vitro*, cultivados em 20% ou 5% O₂ e também em suplementações de glicose distintas (0.6, 2 e 5mM), resultando em 12 grupos de estudo. Os embriões em estágio de blastocisto foram avaliados em 95 caracteres, incluindo 82 genes, 7 evidências bioquímicas (consumo de glicose, glutamato e piruvato; produção de lactato e ATP), geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), atividade mitocondrial e, finalmente, o conteúdo lipídico. Os dados foram normalizados e reunidos em uma matriz que foi analisada em parcimônia, com 500 repetições e Tree-Bisection Reconnection como algoritmo (software TNT) em busca de comportamentos semelhantes entre os grupos. Todos os caracteres foram aditivos e igualmente ponderados. Esta análise resultou em uma única árvore ideal, totalmente resolvida. Os resultados mostram os grupos dispostos em dois arranjos principais de acordo com a tensão de oxigênio, exceto os grupos de embriões lentos cultivados em um ambiente de alta glicose (5mM). Num segundo momento, cada um dos grupos pertencentes aos primeiros arranjos foi novamente analisado. A 5% O₂ (mais semelhante ao encontrado no útero), os embriões se agruparam de acordo com a cinética de desenvolvimento, independentemente da concentração de glicose no meio de cultura. Nesta condição, embriões rápidos foram mais capazes de atingir o estágio de blastocisto sem sobrecarregar o metabolismo. Já a 20% O₂, a suplementação de glicose foi mais importante para o agrupamento. Em um ambiente de alta glicose, em especial os embriões lentos, apresentaram metabolismo alterado e bloqueio de desenvolvimento. No entanto, embriões cultivados em baixas concentrações de glicose foram mais capazes de ativar mecanismos adaptativos e superar as injúrias causadas pelo estresse. A plasticidade embrionária é uma característica única e com esse trabalho conseguimos demonstrar como o

metabolismo se modula para ajudar os embriões a enfrentar condições estressantes enquanto tentam sobreviver a qualquer custo.

Palavras-chave: Embriões. Bovinos. Morfocinética. Metabolismo.

ABSTRACT

DE LIMA, CB. **The relationship between developmental kinetics and metabolic response in bovine embryos submitted to stress during *in vitro* culture.** 2018. 118 p. PhD thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

During *in vitro* culture cells are submitted to many stressful stimuli, however, the heterogeneity of the response to those stimuli is usually not considered. This study was based on a factorial experimental design (2x2x3) created to evaluate how embryos with distinct developmental kinetics respond to the combination of environmental and metabolic stress during *in vitro* culture. For this purpose, Fast (4 or more cells at 22 hours of culture) and Slow embryos (2-3 cells) were produced *in vitro* using standard protocols, cultured in 20% or 5% O₂ and also in distinct glucose concentrations (0, 2 and 5mM), resulting in 12 groups. Blastocysts were evaluated for 95 characters including 82 genes, 7 biochemical evidences: consumption of glucose, glutamate and pyruvate; production of lactate and ATP; generation of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial activity and finally the lipid content. Data were normalized and gathered in a matrix that was analyzed under parsimony, with 500 replicates and Tree-Bisection Reconnection as the swapping algorithm (*TNT software*), searching for similar behaviors. All characters were additive and equally weighted. This analysis resulted in a single optimal tree, fully resolved. Results show the groups arranging in two main clusters according to oxygen tension regardless of developmental kinetics and glucose, except the groups of slow embryos cultured in a high glucose environment (5mM). Each cluster was separately analyzed and at 5% of oxygen (more similar to what is found in the uterus), embryos clustered according to developmental kinetics and independently of glucose concentration in culture media. On that condition, embryos with a faster kinetics were more capable of reaching blastocyst stage without overloading the metabolism. At 20% of oxygen, glucose supplementation seems to be more important for the clustering. In a high glucose environment embryos, in special de slow ones, show altered metabolism and block. However embryos cultured in lower glucose concentrations are more capable of activating adaptive mechanisms and overcome stress injuries. The embryonic plasticity is a unique feature and with this work we were able to demonstrate how metabolism modulates to help the embryos face stressful conditions while trying to survive at any cost.

Key words: Embryos. Bovine. Morphokinetics. Metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do delineamento experimental montado para este estudo.....	35
Figura 2 – Representação esquemática da placa de cultivo individual de embriões.....	36
Figura 3 – Gráfico mostra a curva padrão de glicose construída para este experimento e equação do gráfico utilizada para o cálculo das concentrações em cada amostra.....	42
Figura 4 – Gráfico mostra a curva padrão de piruvato construída para este experimento e equação do gráfico utilizada para o cálculo das concentrações em cada amostra.....	43
Figura 5 – Gráfico mostra a curva padrão de lactato construída para este experimento e equação do gráfico utilizada para o cálculo das concentrações em cada amostra.....	44
Figura 6 – Gráfico mostra a curva padrão de glutamato construída para este experimento e equação do gráfico utilizada para o cálculo das concentrações em cada amostra.....	45
Figura 7 – Gráfico mostra a curva padrão de ATP construída para este experimento e equação do gráfico utilizada para o cálculo das concentrações em cada amostra.....	46
Figura 8 – Representação esquemática da interface entre eletroforese capilar e o espectrômetro de massas operando no modo MRM.....	48
Figura 9 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e da produção de EROs em blastocistos expandidos de bovinos.....	51
Figura 10 – Diagrama não-enraizado mostrando os clusters formados a partir da análise de parcimônia dos dados contínuos normalizados.....	53
Painel 1 – Dados da comparação entre os grupos cultivados a 20 vs. 5% O ₂	55
Figura 11 – Conclusões parciais obtidas das comparações entre grupos cultivados em diferentes tensões de oxigênio.....	60
Painel 2 – Dados da comparação entre os grupos Rápidos e Lentos cultivados a 5% O ₂	61
Figura 12 – Conclusões parciais obtidas das comparações entre grupos Rápidos e Lentos cultivados em 5% de oxigênio.....	65

Painel 3 – Dados da comparação entre os grupos cultivados em diferentes concentrações de glicose a 20% O₂.....67

Figura 13 – Conclusões parciais obtidas das comparações entre cultivados em diferentes concentrações de glicose em 20% de oxigênio.....71

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análise de Variâncias
ATP	Trifosfato de Adenosina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	DNA complementar
CHCl ₃	Clorofórmio
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Gás Carbônico
COCs	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
Ct	Threshold cycle
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EtOH	Etanol
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
h	Horas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HRP	Horseradish peroxidase
HSP	Heat Shock Proteins
L	Lento
M	Molar
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MeOH	Metanol
min	Minuto
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
MS	Espectrometria de Massas
N ₂	Nitrogênio
NH ₄ Ac	Acetato de amônia
O ₂	Oxigênio
PBS	Tampão Fosfato Salina
PPP	Via das Pentoses-fosfato
R	Rápido
Red/Ox	Redução/Oxidação
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNASeq	Sequenciamento de RNA
RT-PCR	Real-time Polymerase Chain Reaction
s	Segundo
SEM	Standard Error of the Mean

SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Synthetic Oviduct Fluid (Fluido do Oviduto Sintético)
SOFaa	Synthetic Oviduct Fluid suplementado com aminoácidos.
TAG	Triacilglicerol
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
U.A.	Unidades arbitrárias
UI	Unidades internacionais
WOW	Well of the Well
x g	Força centrífuga
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
µL	Microlitro
µM	Micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
<	Menor que
=	Igual
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
	2.1 Metabolismo do embrião pré-implantação	23
	2.2 Estresse energético nos embriões produzidos <i>in vitro</i>	26
	2.3 Estresse oxidativo nos embriões produzidos <i>in vitro</i>	28
	2.4 Cinética de desenvolvimento embrionário	29
3	HIPÓTESE	31
4	OBJETIVO	32
	4.1 Objetivos específicos.....	32
5	MATERIAL E MÉTODOS	33
	5.1 Produção de embriões <i>in vitro</i> (PIV).....	33
	5.1.1 Coleta e maturação <i>in vitro</i> de oócitos (MIV).....	33
	5.1.2 Preparação do sêmen	33
	5.1.3 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	33
	5.1.4 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	34
	5.1.5 Cultivo de embriões em atmosfera controlada.....	35
	5.1.6 Cultivo individual de embriões.....	36
	5.2 Quantificação de transcritos por RT-PCR em larga escala	37
	5.2.1 Extração de RNA Total.....	37
	5.2.2 Síntese de cDNA	37
	5.2.3 Pré-amplificação de cDNA.....	38
	5.2.4 Biomark™ HD System – Análise de Expressão Gênica.....	38
	5.3 Avaliação do consumo de glicose no meio de cultura	41
	5.4 Avaliação do consumo de piruvato no meio de cultura	42
	5.5 Avaliação da produção de lactato no meio de cultura	43
	5.6 Avaliação do consumo de glutamato no meio de cultura.....	44
	5.7 Avaliação da produção de ATP nos blastocistos.....	45
	5.8 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio	46
	5.9 Caracterização do perfil lipídico dos blastocistos por MS.....	47

5.9.1	<i>Extração de lipídeos – Bligh & Dyer</i>	47
5.9.2	<i>Monitoramento de reações múltiplas (MS)</i>	47
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	50
6.1	Taxas de produção in vitro de embriões.....	50
6.2	Dados de transcrição gênica obtidos por RT-PCR.....	50
6.3	Avaliações Bioquímicas – consumo de glicose, piruvato e glutamato, produção de lactato e ATP	50
6.4	Avaliações Bioquímicas – potencial de membrana mitocondrial e conteúdo intracelular de EROS	51
6.5	Dados do perfil lipídico por espectrometria de massas	52
6.6	Análise de agrupamento do dados bioquímicos e moleculares.....	52
7	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
7.1	Análise 1: Comparação dos grupos cultivados em 20% vs. 5% O ₂ (com exceção de 5L20 e 5L5)	54
7.2	Análise 2: Comparação dos grupos com diferentes cinéticas de desenvolvimento em 5% O ₂	60
7.3	Análise 3: Comparação dos grupos cultivados com diferentes suplementações de glicose em 20% O ₂	65
8	CONCLUSÃO	72
9	FUTUROS PASSOS	73
	ANEXO A	81
	APÊNDICE A	84
	APÊNDICE B	85
	APÊNDICE C	95
	APÊNDICE D	104
	APÊNDICE E	112

1 INTRODUÇÃO

Embora o sistema de cultivo *in vitro* (CIV) de embriões tente mimetizar o que ocorre *in vivo*, os embriões produzidos *in vitro* acabam sendo expostos a diversos tipos de estresse que normalmente não sofreriam no interior do trato reprodutivo. Sabe-se que um número grande de fatores pode influenciar significativamente o microambiente do cultivo e como exemplo podemos citar a composição do meio de cultura, a suplementação do meio com proteínas, o número de embriões presentes em cada gota e a tensão de oxigênio [Gardner and Harvey, 2015].

Muitas mudanças já foram realizadas nos protocolos de CIV na tentativa de minimizar o estresse causado para as células e melhorar a qualidade dos blastocistos produzidos. Entretanto, embora as condições de cultivo ainda não se apresentem de maneira ideal para um desenvolvimento embrionário apropriado, grande parte dos problemas técnicos que a CIV apresenta possuem chances de serem solucionados por meio de pesquisas inovadoras relacionadas aos sistemas de cultivo e identificação dos embriões mais aptos a gerarem prenhez [Hensen et al., 2008].

Assim, uma vez que sejam compreendidas as condições estressoras as quais os embriões estão submetidos no sistema *in vitro* e quais são as consequências deste estresse para o fenótipo em desenvolvimento, seria possível, empiricamente, formular estratégias de modulação e otimização do sistema para gerar embriões que sejam metabolicamente mais semelhantes aos produzidos *in vivo*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial, sendo o Brasil dono do segundo maior rebanho efetivo do mundo e que é responsável pelo desenvolvimento de dois segmentos lucrativos: as cadeias produtivas da carne e leite [Ministério da Agricultura, 2014]. De acordo com previsões fornecidas pela Coordenação Geral de Planejamento Estratégico do Ministério da Agricultura, a produção de carne (bovina, suína e aves) deverá aumentar em 12,6 milhões de toneladas até 2018/2019. Além disso, devido a preferência dos brasileiros por carne bovina, deve haver um aumento de cerca de 42% no consumo neste setor nos próximos 4 anos. Já o consumo de leite deve crescer a uma taxa de 1,9% ao ano neste mesmo período. Este valor acompanha a produção do país, mas a longo prazo coloca o consumo um pouco acima da produção nacional, o que indica que provavelmente serão necessárias importações neste setor [Ministério da Agricultura, 2014].

Neste contexto, o homem tem realizado esforços para incrementar a produtividade na exploração das espécies domésticas, e isto tem acontecido de diversas formas. Modificações na nutrição, instalações, manejo sanitário e reprodutivo têm sido incrementados há várias décadas, mas mesmo assim, a produção bovina ainda tem dificuldades de atingir sua eficiência máxima. Por esta razão, novas tecnologias e pesquisas inovadoras são necessárias visando o melhoramento genético e o aumento de produtividade [Lonergan and Fair, 2008].

Desde o nascimento do primeiro bezerro derivado de fertilização *in vitro* (FIV) em 1981, houve um grande progresso no desenvolvimento das técnicas relacionadas a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, seja para fins de pesquisa ou comerciais. Estes embriões tem sido muito utilizados para geração de mais animais economicamente úteis e também como modelos experimentais para algumas doenças [Hall et al., 2013]. Entretanto, a porcentagem de embriões PIV capazes de se desenvolver normalmente ainda é substancialmente menor do que a de embriões produzidos *in vivo* [Cagnone and Sirard, 2016].

Neste sentido, muitos estudos já comprovaram diferenças existentes entre estes dois tipos de embriões. Quando comparados a embriões *in vivo*, os embriões PIV em geral possuem um menor número de células, apresentam danos indesejados com relação a morfologia, anormalidades cromossômicas, menor tolerância a criopreservação e diminuição da viabilidade [Viuff et al., 2000; Ohlweiler et al., 2013, Cagnone and Sirard, 2016]. Além

disso, o cultivo *in vitro* já foi associado a alguns efeitos a longo prazo para a saúde da prole, como por exemplo a alta incidência de síndromes do desenvolvimento [Alukal and Lipshultz, 2008], peso elevado dos bezerros ao nascer e o aumento da mortalidade perinatal [Farin et al., 2006].

A produção *in vitro* de embriões bovinos é um processo que envolve três passos fundamentais: a maturação oocitária, a fertilização (o que inclui a preparação dos espermatozoides) e a cultura do zigoto e, sendo assim, desvios no processo normal podem surgir em qualquer uma destas três etapas. Embora muitos avanços tenham sido feitos com relação a estes procedimentos, a PIV ainda é considerada uma biotecnologia de baixa eficiência, já que durante a PIV de embriões bovinos, cerca de 80% dos oócitos aspirados são fecundados e concluem pelo menos até o segundo ciclo celular, e destes apenas 30-40% são capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto [Lonergan et al., 2003b].

O embrião pré-implantacional deve seguir uma sequência altamente organizada de eventos durante seu desenvolvimento como por exemplo a formação dos pró-núcleos, a ativação do genoma embrionário, sucessivas clivagens celulares, compactação e formação da blastocle [Zernicka-Goetz et al., 2009]. Na prática, isto significa que o embrião precisa tomar várias decisões – quiescência, proliferação, diferenciação ou migração – num ambiente que se modifica constantemente, e portanto, atividades complexas como estas requerem uma adequada produção e distribuição de energia. Atualmente, os esforços dos pesquisadores se concentraram no metabolismo embrionário como a chave para um desenvolvimento competente, assumindo que o embrião pode se desenvolver sem perturbações se uma combinação apropriada de recursos for disponibilizada [Chanson et al., 2011]. No entanto, o embrião pré-implantacional é muito dinâmico e a compreensão dos processos que culminam em seu desenvolvimento normal ainda é escassa.

2.1 Metabolismo do embrião pré-implantação

Os efeitos do sistema *in vitro* no desenvolvimento embrionário iniciam-se logo na maturação oocitária *in vitro* (MIV), pois a transformação de um oócito em um embrião de qualidade trata-se de um processo extenso onde cada passo é determinante para o sucesso dos estágios seguintes. Durante a maturação, o oócito passa por uma série de mudanças com relação a organização citoplasmática, aumentando o armazenamento de lipídeos que servirão como fonte de energia para as transformações do embrião e promovendo o rearranjo de organelas como as mitocôndrias e os ribossomos [Lonergan and Fair, 2016]. A exposição do

oócito a condições adversas, justamente como as promovidas pela própria maturação *in vitro*, aumenta as chances da presença de RNAm degradados que podem causar grandes efeitos sobre o embrião subsequente [Baillet et al., 2012].

Já após a fertilização, durante o desenvolvimento inicial os embriões apresentam metabolismo próprio, característico dos blastômeros, lento nas primeiras clivagens, seguido de uma aceleração para suportar a intensa proliferação e diferenciação celular [Leese et al., 2007]. Durante as primeiras divisões, a transcrição gênica é silenciada e o metabolismo inicial é sustentado por transcritos e proteínas que foram produzidos e armazenados durante a maturação do oócito [Vigneault et al., 2004; Cagnone & Sirard, 2013].

Esta fase de quiescência é seguida pela ativação do genoma embrionário que no embrião bovino acontece nos estágios entre 8 e 16 células e marca um evento crucial para sustentar os processos do desenvolvimento inicial [Vigneault et al., 2004; 2009]. O início da transcrição dos genes do embrião exige muito da maquinaria celular responsável pela expressão de genes e síntese de proteínas que serão responsáveis por controlar a compactação da mórula e o desenvolvimento do blastocisto [Hamatani et al., 2006; Rodriguez-Zas et al., 2008]. Nesta fase, a manutenção da estabilidade dos transcritos provenientes do oócito é de fundamental importância para o correto início da tradução de proteínas, e a presença de RNAm degradados pode levar a um aumento na demanda energética dos embriões, uma vez que estes RNAs devem ser removidos e substituídos [Cagnone & Sirard, 2013].

Embora tantas mudanças sejam necessárias para adaptar a homeostase as condições do ambiente, acredita-se que perturbações, por menores que sejam, podem levar a ativação inadequada do genoma embrionário e afetar genes importantes, o que resultaria em estresse celular grande e uma baixa qualidade do blastocisto em desenvolvimento [Fernández-Gonzalez et al., 2009]. Sendo assim, podemos considerar que a fase de transição materno-embrionária ainda é uma fase bastante crítica, podendo comprometer o desenvolvimento até fases posteriores.

O requerimento de energia durante o desenvolvimento pré-implantacional varia de acordo com o estágio em que embrião se encontra e também com a disponibilidade de substratos ao seu redor [Gardner and Harvey, 2015]. Durante as primeiras clivagens, mesmo com a replicação do DNA e divisão celular, os requerimentos energéticos ainda são baixos e a alta razão ATP:ADP é responsável por inibir alostericamente a enzima fosfofrutoquinase (PFK), fator limitante para a oxidação da glicose [Gardner and Harvey, 2015]. Assim, a produção de ATP é mantida pela oxidação de substratos como o piruvato e o lactato através

da via glicolítica. A utilização da glicose passa a aumentar gradativamente e o metabolismo oxidativo tem sua primeira marca no estágio de 12 a 16 células, justamente quando ocorre a ativação do genoma embrionário [Rollo et al., 2017; Vigneault et al., 2009].

Nesta fase de compactação da mórula, o consumo de oxigênio e a produção de ATP aumentam principalmente para dar suporte a proliferação celular, aumento da síntese proteica e ao funcionamento da bomba de Na^+/K^+ ATPase para a expansão da blastocele. Com isso, a relação ATP: ADP cai, a geração de energia deixa de ser dependente da oxidação de piruvato e passa a utilizar a glicose através da fosforilação oxidativa, que é notavelmente mais eficiente [Gardner & Harvey, 2015].

Entretanto, sabe-se que parte do desafio de desenvolver um sistema de cultivo otimizado reside no fato de que o metabolismo do embrião pré-implantacional é substancialmente diferente de uma célula somática diferenciada. Em um metabolismo celular típico, a glicose é convertida a piruvato pela via glicolítica, e este entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), onde é oxidado para a produção de ATP. Todavia, no blastocisto apenas parte da glicose internalizada é convertida desta maneira. Outra parte é convertida a lactato, mesmo na presença de oxigênio suficiente para dar suporte a sua completa oxidação, fenômeno conhecido como efeito Warburg ou glicólise aeróbica [Gardner and Harvey, 2015]. O redirecionamento do piruvato para a glicólise aeróbica causa considerável aumento na produção de lactato pelo blastocisto, o que poderia facilitar eventos-chave no processo de implantação como a invasão, proliferação, angiogênese e modulação de resposta imune no sítio de implantação, assim como ocorre em células cancerígenas [Gardner, 2015].

Além da conversão a lactato, a glicose internalizada pode seguir para a via das pentoses-fosfato (PPP). Isto acontece pois células altamente proliferativas como as do embrião possuem outros requerimentos metabólicos que vão além da produção de ATP. A necessidade de produção de macromoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídeos é considerada mais “urgente”. Sendo assim, a produção de ribose-5-fosfato (R5P) para a síntese de ácidos nucleicos, de ácidos graxos para a síntese lipídica e a manutenção do sistema redox podem ser metas mais relevante para o metabolismo da glicose [Cairns et al. 2011].

As células do embrião alcançam este fenótipo diferenciado alterando a expressão de uma série de enzimas metabólicas e transportadores de nutrientes. Um exemplo deste cenário seria o estímulo da enzima piruvato desidrogenase quinase (PDK1), cuja função é fosforilar as subunidades da enzima piruvato desidrogenase (PDH), regulando negativamente a conversão de piruvato a acetil-CoA e, conseqüentemente, o fluxo deste para a via do TCA. Esta

desaceleração da glicólise leva ao acúmulo de intermediários da via glicolítica como a frutose-bis-fosfato e o fosfoenolpiruvato, que por sua vez favorecem as fases oxidativa e não oxidativa da via das pentoses, culminando no aumento da produção de NADPH e R5P [Krisher & Prather, 2012].

Considerando estas informações, fica fácil entender porque o carbono oriundo dos carboidratos não pode ser comprometido com a geração de ATP pela fosforilação oxidativa, uma vez que isto seria contraproducente para as necessidades biossintéticas das células em proliferação [Vander Heiden et al. 2009]. Portanto, fontes alternativas adequadas, tais como ácidos graxos ou aminoácidos, devem estar disponíveis para atividade basal do TCA e produção de ATP.

Apesar da vasta literatura a respeito da importância do metabolismo de carboidratos (glicose, piruvato e lactato) para o desenvolvimento embrionário, pouco se sabe a respeito do metabolismo de lipídeos endógenos. Além de seu importante papel como unidades estruturais na formação de membranas e em vias de sinalização celular, os lipídeos são uma potencial fonte de energia para o embrião através da β -oxidação de ácidos graxos. O metabolismo de 1 M de ácido palmítico (C16:0), por exemplo, produz em média 106 M de ATP em comparação com 1 M glicose produzindo 27 a 31 M de ATP [Sutton-McDowall et al., 2012].

Em geral, os lipídeos ficam armazenados no citoplasma na forma de gotas lipídicas compostas principalmente por triacilgliceróis (TAG) e ésteres de colesterol [Sudando et al., 2016; Cagnone and Sirard, 2016]. Entretanto, já foi estabelecida uma relação inversa entre qualidade embrionária e conteúdo lipídico. De forma geral, fatores que contribuem para o comprometimento da viabilidade, resultam em aumento do conteúdo lipídico. Como exemplo, temos a adição de soro fetal bovino, comumente utilizado na preparação dos meios de cultivo, e que já foi relacionado com degeneração celular, baixa criotolerância [Sudano et al., 2014] e também com o aumento da expressão de genes relacionados a síntese lipídica e metabolismo de colesterol [Van Hoecke et al., 2015].

2.2 Estresse energético nos embriões produzidos *in vitro*

Uma série de evidências mostram que os embriões produzidos *in vitro* carregam as marcas do estresse energético em termos de utilização de nutrientes [Cagnone and Sirard, 2016]. Isto se dá majoritariamente por conta do suporte inadequado oferecido pelos sistemas de cultivo existentes.

Neste sentido, uma das primeiras coisas que se compreendeu sobre o impacto do cultivo *in vitro* no metabolismo em embriões foi que a concentração de glicose tipicamente usada em meios de cultura para células somáticas (cerca de 5 mM) é deletéria para embriões iniciais, antes da transição materno-embriônica, provavelmente por conta de um efeito conhecido como “Crabtree”, que leva a hiperestimulação da glicólise, alteração do metabolismo oxidativo e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) [Cagnone and Sirard, 2016].

No fluido do oviduto de bovinos, a concentração de glicose (2mM) é mais baixa do que no plasma sanguíneo (4mM), o que indica uma expressão diferencial deste substrato para adequação ao metabolismo embrionário [Hugentobler et al., 2008]. Estudos anteriores demonstraram que a exposição à glicose durante as primeiras clivagens em um sistema não otimizado pode resultar em diminuição da viabilidade, bloqueio no desenvolvimento no momento da ativação do genoma e blastocistos de baixa qualidade [Cagnone et al., 2012].

Em outras espécies, como os murinos, já foi demonstrado que hiperglicemia pode induzir a fragmentação de DNA e levar a apoptose [Moley et al. 1998]. Resultados semelhantes foram obtidos em suínos, onde o cultivo inicial com altas concentrações de glicose levou a maior produção de EROs e ao comprometimento da fosforilação oxidativa [Cagnone and Sirard, 2016].

Apesar disso, o consumo de glicose em cultivo individual de embriões humanos tem sido evidenciado como marcador de viabilidade embrionária após a transferência. Em 2011, Gardner e colaboradores relataram que embriões que geraram prenhez apresentavam maior consumo de glicose na fase de mórula do que aqueles com menor consumo [Gardner et al., 2011]. Outro estudo baseado no transcriptoma de blastocistos tratados com altas quantidades de glicose revelou, juntamente com as baixas taxas de sobrevivência, uma desregulação na expressão genética quando comparados aos blastocistos produzidos *in vivo* [Cagnone et al., 2012].

Assim, fica claro que, o cultivo *in vitro* ainda é falho no que diz respeito ao suporte para um metabolismo energético adequado, necessitando então de melhorias que possam ao menos amenizar a intensidade da resposta ao estresse e garantir um desenvolvimento de maior qualidade.

2.3 Estresse oxidativo nos embriões produzidos *in vitro*

Outro fator relevante para o correto desenvolvimento embrionário é a manutenção da homeostase oxidativa. O equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a produção de enzimas antioxidantes é essencial para a ocorrência de inúmeros processos fisiológicos. *In vivo* este equilíbrio é alcançado graças ao eficiente sistema red/ox do oviduto, que garante um ambiente ideal para a passagem do embrião [Guerin et al., 2001]. No entanto, no ambiente *in vitro*, a maior tensão de oxigênio utilizada é responsável por um aumento na produção de EROs, deixando gametas e embriões expostos aos radicais livres sem a proteção enzimática dos antioxidantes presentes durante a fertilização *in vivo* [Gupta et al., 2010], o que os torna altamente susceptíveis a danos.

Os efeitos patológicos das EROs são exercidos por diversos mecanismos que incluem os danos aos lipídeos e ao DNA, inibição da síntese proteica e depleção dos níveis de ATP. Além disso, os radicais livres podem ter efeitos deletérios sobre constituintes celulares como a membrana plasmática e as organelas, e também sobre a cinética do desenvolvimento embrionário [Agarwal et al., 2006].

Sendo assim, a ativação de mecanismos embrionários de proteção contra agentes oxidantes é uma alternativa para melhorar a qualidade dos embriões e consequentemente sua competência [Takahashi, 2012]. Muitos compostos já foram descritos como facilitadores da defesa contra o estresse oxidativo. Entre eles estão os compostos não-enzimáticos como as Vitaminas C e E, e os componentes enzimáticos como a Glutathione peroxidase (GPx), Catalase (CAT) e a Superóxido dismutase (SOD). Estes compostos tem sido normalmente utilizados para suplementar o meio de cultura em busca de embriões de melhor qualidade [Amin et al., 2014].

Uma vez que as EROs podem modular tantos processos celulares, não é surpreendente que o estresse oxidativo não ocorra de maneira isolada, mas sim acompanhado por outras formas de estresse celular. Como exemplo, podemos citar a íntima relação existente entre a regulação da presença das EROs e as funções mitocondriais e do retículo endoplasmático mediadas pela liberação de Ca^{2+} [Burton & Jauniaux, 2011]. O aumento citosólico de cálcio causa efeitos adversos na função mitocondrial, incluindo um aumento interno da produção de EROs e a alteração da permeabilidade da membrana através da abertura de poros. A abertura dos poros faz com que a mitocôndria perca potencial de membrana e, consequentemente, a produção de ATP entre em colapso. Caso as concentrações de ATP caiam significativamente, haverá perda da homeostase iônica e a liberação de moléculas como a capase-9 (iniciadora)

que, através de uma reação em cascata, ativa uma série de outras moléculas efetoras. A célula entra então em processo inicial de necrose, que se não for revertido culmina em apoptose [revisado por Elmore et al., 2007].

No retículo endoplasmático, a abertura de canais iônicos como os de cálcio afeta de forma determinante a sua função. A perda da atividade das chaperonas, por exemplo, leva ao acúmulo de proteínas mal empacotadas no lúmen desta organela o que leva a um aumento na produção EROs e a ativação de uma série de vias adaptativas. Como exemplo temos a transcrição de genes específicos como o ATF4 que garante o suprimento de aminoácidos para a biossíntese de enzimas como a glutatona sintetase (GSH) que protege as células contra o estresse oxidativo [Harding et al., 2003]. A ativação desta resposta ao estresse parece ter um papel essencial na adaptação das células as consequências metabólicas da atividade do retículo endoplasmático. Caso o estresse seja prolongado haverá o desencadeamento do processo apoptótico [Wang et al., 2008; Banhegyi et al., 2007].

2.4 Cinética de desenvolvimento embrionário

A viabilidade e a capacidade de responder ao estresse também parecem estar relacionadas com a cinética embrionária. Estudos anteriores indicaram que o tempo que o embrião leva para atingir o estágio de 4 células poderia ser um bom preditor de formação de blastocistos e boa morfologia em humanos [Cruz et al., 2012]. Além disso, a cinética das primeiras divisões celulares tem sido associada a fenótipos diferentes no estágio de blastocisto.

Neste sentido, outros estudos deste grupo realizaram a caracterização bioquímica e molecular de embriões com diferentes cinéticas de desenvolvimento [Milazzoto et al., 2016, Silva et al., 2016, dos Santos et al., 2016] e mostraram que embriões com cinética rápida possuem um metabolismo mais elevado e maior capacidade de ativar vias adaptativas e mecanismos de sobrevivência através da transcrição de genes ligados a resposta ao estresse. Corroborando estes achados, o meio de cultivo de embriões rápidos também indicou a presença de metabólitos relacionados a resposta ao estresse.

Além disso, também foi possível observar que no período da ativação do genoma, embriões de desenvolvimento mais lento sofrem mais com os eventos que levam a apoptose, sugerindo que estes estejam passando por um mecanismo de seleção pelo qual apenas os embriões mais adaptáveis seriam capazes de superar um bloqueio na transição materno-fetal e alcançar o estágio de blastocisto [Silva et al., 2016].

Além da cinética, em 2002, Leese propôs que a viabilidade celular está associada a um metabolismo mais silencioso, ou seja, células mais viáveis gastariam menos energia na reparação do genoma, do transcriptoma e do proteoma. Sendo assim, em um embrião viável, o genoma não estaria comprometido e seria capaz de dar suporte aos eventos do desenvolvimento utilizando menos nutrientes e com um menor consumo de oxigênio. Em contraste, embriões menos viáveis possuem maiores danos moleculares ou estão menos preparados para lidar com os danos existentes e, portanto, seu metabolismo mais “ativo” é refletido no maior consumo de nutrientes utilizados pelos mecanismos de reparo [Leese, 2002].

A caracterização do padrão de expressão de genes durante o desenvolvimento embrionário assinala a importância da regulação da expressão destes genes diante de estímulos externos. Diferenças nos níveis de expressão podem refletir inadequações das condições do cultivo, resultado, por exemplo, de um estado de red/ox inadequado [Harvey et al., 2002]. Entretanto, a expressão de genes é apenas um aspecto da complexa rede regulatória que permite a célula responder a sinais intra e extracelulares.

Assim, acreditamos que através da investigação de mecanismos moleculares que relacionem a competência do embrião aos estressores existentes na produção *in vitro* seja possível desenvolver estratégias alternativas para a modulação e para a reformulação empírica dos métodos de cultivo.

3 HIPÓTESE

Com base nos dados apresentados, é possível compreender que o controle metabólico do blastocisto é bastante delicado e, em geral, feito através de vias sensíveis à disponibilidade de nutrientes e de oxigênio. Mais ainda, a resposta embrionária pode ser bastante heterogênea e isto precisa ser levado em consideração para a formulação de um sistema de cultivo *in vitro* mais adequado.

Portanto, a hipótese deste trabalho é que embriões com diferentes cinéticas de desenvolvimento respondem diferencialmente ao estímulos estressores inerentes a um sistema de cultivo não otimizado e estas respostas estão relacionadas a mudanças no padrão de expressão gênica, no consumo/secreção de componentes do metabolismo energético e no perfil lipídico.

4 OBJETIVO

Realizar a caracterização bioquímica e molecular da resposta embrionária a diferentes condições no sistema de cultivo *in vitro* e relacionar estes dados com as diferentes cinéticas de desenvolvimento do embrião (clivagem rápida e clivagem lenta).

4.1 Objetivos específicos

Avaliar ao longo do cultivo de embriões bovinos PIV de diferentes cinéticas de desenvolvimento (rápido e lento) mantidos sob condições de estresse ambiental (tensão de oxigênio) e metabólico (suplementação de glicose) no sistema de cultivo:

- O padrão de produção e consumo de substratos energéticos (glicose, lactato, piruvato e glutamato);
- A atividade mitocondrial e a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio;
- A produção de ATP;
- Diferenças no padrão de expressão de genes relacionados a diferentes vias metabólicas importantes para o desenvolvimento embrionário.
- O conteúdo intracelular de lipídeos (triacilglicerol, ésteres de colesterol, ácidos graxos livres e carnitinas).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os embriões utilizados neste estudo foram produzidos *in vitro* de acordo com protocolos já bem estabelecidos.

5.1 Produção de embriões *in vitro* (PIV)

5.1.1 Coleta e maturação *in vitro* de oócitos (MIV)

No laboratório, os oócitos provenientes de ovários obtidos em abatedouro comercial foram coletados por aspiração folicular com auxílio de seringa e agulha. Os complexos *cumulus*-oócito (COCs) foram recuperados e selecionados para posterior maturação *in vitro* (MIV). Para a MIV, os oócitos foram lavados em meio pré-MIV e meio MIV (Anexo A), sendo em seguida colocados em gotas de 90µL do meio de maturação, sob óleo mineral. A maturação foi realizada em incubadora a 38.5 °C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade por 24 horas.

5.1.2 Preparação do sêmen

Palhetas de sêmen de 2 touros foram descongeladas em banho-maria a 37 °C durante 30 segundos e seu conteúdo centrifugado em gradiente Percoll® (45% e 90% – Anexo A) para separação dos espermatozoides móveis, remoção do diluidor e do plasma seminal, além da separação de células não espermáticas. O sobrenadante foi descartado, e foi realizada avaliação da motilidade e concentração espermática por microscopia óptica. Os espermatozoides vivos foram diluídos em meio TL Sêmen (Anexo A) na concentração de 1x10⁶ espermatozoides/mL.

5.1.3 Fecundação *in vitro* (FIV)

Os oócitos maturados foram fecundados *in vitro* em gotas de 90µL do meio FIV gota (Anexo A) (Parrish *et al.*, 1988). Para a inseminação, 5µL do sêmen preparado foram adicionados às gotas (25-30 oócitos/gota) e cobertas com óleo mineral, onde permaneceram em atmosfera com 5% de CO₂ em ar, 38.5°C e alta umidade por 18 horas.

5.1.4 Cultivo *in vitro* (CIV)

Cerca de 18 horas após a FIV, os presumíveis zigotos foram desnudados com auxílio de pipeta e transferidos para gotas de 90µL do meio SOFaa (*Synthetic Oviduct Fluid*) (Anexo A) suplementado com 2% de aminoácidos essenciais, 1% de aminoácidos não essenciais e 5% de SFB). Após a denudação, os presumíveis zigotos foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos que foram cultivados sob diferentes tensões de oxigênio:

- **Alto O₂ (20%)** – sistema de cultivo *in vitro* não-otimizado.
- **Baixo O₂ (5%)** – comparável ao que é encontrado no oviduto.

Às 22 horas após o início do cultivo, os embriões de ambos os grupos foram avaliados e classificados de acordo com a cinética de clivagem em **Rápidos** (4 ou mais células) ou **Lentos** (2 ou 3 células). Cerca de 80 horas após o início do cultivo (dia 3), estes embriões foram novamente divididos aleatoriamente em 3 diferentes suplementações de glicose no meio SOFaa: **0.6mM** (equivalente a 5% de SFB), **2mM** (equivalente ao encontrado no trato reprodutivo da vaca) e **5mM** (condição de hiperglicemia). O desenho final do estudo pode ser observado na Figura 1.

Figura 1: Representação esquemática do delineamento experimental montado para este estudo.

Após os procedimentos de maturação e fertilização *in vitro*, os presumíveis zigotos foram distribuídos aleatoriamente para o cultivo *in vitro* em tensão de 20 ou 5% O₂. Às 22 horas após o início do cultivo, os embriões foram classificados como Rápidos ou Lentos. Cerca de 80 horas após o início do cultivo, os embriões são transferidos também aleatoriamente para os 3 tratamentos de glicose (0.6, 2mM ou 5mM) resultando no total de 12 grupos de estudo.

Em uma primeira etapa, a coleta dos embriões foi feita cerca de 168 horas após o início do cultivo (dia 7), quando alcançam o estágio de blastocisto expandido. Os embriões foram mantidos congelados a -80°C ou utilizados a fresco dependendo da análise.

5.1.5 Cultivo de embriões em atmosfera controlada

Para o cultivo em diferentes tensões de oxigênio, a partir da CIV, os embriões foram divididos em dois grupos. O grupo mantido em alta tensão de oxigênio (20%) foi cultivado em incubadora a 38.5°C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e alta umidade.

O grupo mantido em tensão próxima à fisiológica (5%) foi colocado em câmaras seladas contendo mistura de gases com 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂ (Apêndice A) e 5mL de água milli-Q para manter a alta umidade (Apêndice A). A mistura de gases foi obtida com laudo, mas para garantir a eficiência do sistema utilizamos também o *Fyrite® Gas Analyzer*

(*Bacharach, USA*) para confirmar a tensão de O_2 desejada no interior do sistema. As câmaras com tensão de 5% de O_2 foram mantidas na incubadora a $38.5^\circ C$.

5.1.6 Cultivo individual de embriões

Em uma segunda fase do estudo, os embriões passaram a ser cultivados individualmente durante as últimas 48 horas. Para isso, foi utilizado o modelo Well of the Well (WOW) adaptado de Vajta et al. (2000), em um protocolo pré-estabelecido pelo grupo de pesquisa [Annes et al., 2017].

No sistema WOW convencional, cavidades são confeccionadas na placa de cultivo e cada embrião é colocado em uma cavidade de modo que, embora seu microambiente fique restrito, os embriões compartilham ainda o meio de cultura como representado na Figura 2A. Já no modelo adaptado proposto pelo nosso grupo, tanto o embrião quanto o meio de cultura são individualizados, como representado na Figura 2B.

Figura 2: Representação esquemática da placa de cultivo individual de embriões.

Em (A) Esquema do sistema Well of the Well convencional onde embriões compartilham meio de cultura. (B) Esquema do sistema individual onde não há compartilhamento de meio de cultura.

Cada placa de cultivo utilizada neste modelo foi confeccionada da seguinte forma: inicialmente foram feitas gotas de $20\mu L$ de meio de cultivo (SOFaa 0.6mM, 2mM ou 5mM de Glicose) utilizando um mapa. Em seguida, com o auxílio de um furador pontiagudo, o fundo da placa foi gentilmente pressionado para a criação de um poço de aproximadamente $120\mu m$. Para finalizar, todas as gotas foram cobertas com óleo mineral.

Os embriões de cada grupo foram então transferidos individualmente para os respectivos poços com o auxílio de um capilar e permaneceram nas mesmas condições de cultivo (20 ou 5% de O_2 , $38.5^\circ C$ e alta umidade) até o momento da coleta. Assim que os

blastocistos foram retirados, os meios de cultivo também foram coletados com auxílio da pipeta, transferidos para tubos e armazenados a -80°C para posterior análise.

5.2 Quantificação de transcritos por RT-PCR em larga escala

A análise do perfil de transcrição foi feita utilizando os ensaios TaqMan® específicos para *Bos Taurus* através da plataforma *Biomark™ HD System* (Fluidigm, San Francisco – USA) que permite a automatização das reações de RT-PCR em um sistema de microfluídica. Isto permite o uso de um volume menor de amostras e ensaios, bem como resultados mais consistentes.

5.2.1 Extração de RNA Total

Para a extração do RNA, foi utilizado o *PicoPure® RNA Isolation Kit* (*Applied Biosystems™, USA KIT0204*) e o protocolo seguiu de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, a cada um das amostras foi adicionado o volume de 100µL de *Extraction Buffer* (XB) e a mistura foi incubada a 42°C por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000 x g por 2 minutos e o sobrenadante transferido cuidadosamente para um novo tubo.

Para o condicionamento da coluna de purificação de RNA, foram adicionados 250µL de *Conditioning Buffer* (CB) a cada coluna. As mesmas foram então incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente e por fim centrifugadas a 16.000 x g por 1 minuto. Após a etapa de pré-condicionamento, a cada amostra foram adicionados 100µL de etanol 70% (EtOH) e o conteúdo foi finalmente transferido para a coluna de extração e centrifugado para a ligação do RNA à membrana. A coluna foi tratada com DNase (*Qiagen, USA #79254*), incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e novamente centrifugada. Contaminantes foram então removidos por sucessivas centrifugações com solução de lavagem e o RNA eluído da membrana da coluna com o uso de tampão.

5.2.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems, USA #4368814*). O RNA das amostras foi quantificado com o uso do equipamento *NanoDrop* (*NanoDrop™, Thermo Fisher Scientific, USA*) e a concentração das mesmas ajustadas com água ultrapura livre de nucleases. Foram utilizados 10µL de cada

amostra de RNA, aos quais foram adicionados 2µL de solução tampão para transcrição reversa, 0,8µL de dNTPs, 2 µL de solução de primers aleatórios, 4,2 µL de água ultrapura livre de nucleases e, por fim, 1µL de transcriptase reversa. As amostras foram então colocadas no termociclador para ciclo de 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C. Ao término, o cDNA foi armazenado a -20°C.

5.2.3 Pré-amplificação de cDNA

Antes da corrida de qPCR, cada amostra foi submetida a um processo de pré-amplificação. Esta fase é necessária para a reação de RT-PCR realizada pelo *BioMark™ HD*, uma vez que o sistema realiza simultaneamente a reação de até 96 genes para até 96 amostras. A pré-amplificação utiliza um mix dos ensaios TaqMan® (2µL de cada ensaio utilizado + 8µL de tampão) e é feita de acordo com o seguinte protocolo: 1,25µL assay mix, 2,5 µL TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) e 1,25µL de cada amostra de cDNA. As reações foram ativadas a 95°C por 10 min, seguidos de desnaturação 95°C por 15 s, anelamento e amplificação a 60°C por 4 minutos durante 14 ciclos em termociclador. Os produtos desta pré-amplificação foram diluídos 5x antes da análise por RT-qPCR.

5.2.4 Biomark™ HD System – Análise de Expressão Gênica

Para a análise de expressão gênica, a solução preparada consistiu de 2,25 µL de cDNA (produtos da pré-amplificação), 2,5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems) e 2.5 µL de 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm). O chip 96.96 (Dynamic Array™ Integrated Fluidic Circuits – Fluidigm) foi utilizado para a coleta de dados. Primeiramente, o chip foi carregado com 5µL de cada amostra e 5µL de cada ensaio. A corrida de qPCR foi feita no *Biomark™ HD System* usando o protocolo TaqMan® GE 96x96 padrão, que consiste em 5 min de ativação da enzima a 95°C seguido por 40 ciclos de desnaturação e extensão (95°C por 15s e 60°C por 60s). Toda a análise foi feita em quadruplicata e os valores de Ct (*Threshold Cycle*) foram calculados através do software do sistema (Biomark Real-time PCR Analysis, Fluidigm).

Quadro 1: genes candidatos selecionados para avaliação, separados de acordo com suas respectivas funções.

Gene	Nome	Função
CPT1B	Carnitine Palmitoyltransferase 1B	beta-oxidação de ácidos graxos
CPT2	Carnitine Palmitoyltransferase 2	beta-oxidação de ácidos graxos
BMP15	Bone Morphogenetic Protein 15	controle da expressão gênica
PAF1	RNA Polymerase II Associated Factor	controle da expressão gênica
REST	RE1-Silencing Transcription factor	controle da expressão gênica
STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3	controle da expressão gênica
Dnmt1	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 1	controle da expressão gênica / epigenética
Dnmt3A	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3A	controle da expressão gênica / epigenética
Dnmt3B	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3B	controle da expressão gênica / epigenética
H3F3A	H3 histone family member 3A	controle da expressão gênica / epigenética
H3F3B	H3 histone family member 3B	controle da expressão gênica / epigenética
HDAC2	Histone Deacetylase 2	controle da expressão gênica / epigenética
TFAM	Mitochondrial transcription factor A,	controle da expressão gênica / epigenética
ATF4	Activating transcription factor 4	controle da expressão gênica / resposta ao estresse
DDIT3	DNA Damage Inducible Transcript 3	controle da expressão gênica / resposta ao estresse
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1	controle da expressão gênica / resposta ao estresse
CDX2	Caudal type homeobox 2	diferenciação celular
NANOG	Nanog homeobox	diferenciação celular
POU5F1	POU class 5 homeobox 1	diferenciação celular
IGF1R	Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor	fator de crescimento celular
IGFBP2	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2	fator de crescimento celular
IGFBP4	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 4	fator de crescimento celular
ACTB	Actin, beta	gene endógeno
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A	gene endógeno
ACACA	Acetyl-CoA Carboxylase Alpha	metabolismo de lipídeos
ACSL1	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	metabolismo de lipídeos
ACSL3	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	metabolismo de lipídeos
ACSL6	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	metabolismo de lipídeos
EGFR	epidermal growth fator receptor	metabolismo de lipídeos
ELOVL6	Fatty acid elongase 6	metabolismo de lipídeos
FADS2	Fatty acid desaturase 2	metabolismo de lipídeos
FASN	Fatty acid synthase	metabolismo de lipídeos
GPAM	Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase	metabolismo de lipídeos
HMGCS1	3-Hydroxy-3- Methylglutaryl-CoA Synthase 1	metabolismo de lipídeos
LIPE	Lipase E	metabolismo de lipídeos

PPARA	peroxisome proliferator activated receptor alpha	metabolismo de lipídeos
PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gama	metabolismo de lipídeos
PPARGC1A	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha	metabolismo de lipídeos
SCD	Stearoyl-CoA desaturase	metabolismo de lipídeos
SREBF1	Sterol Regulatory Element Binding Transcription F1	metabolismo de lipídeos
ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	metabolismo energético
ATP5L	ATP Synthase	metabolismo energético
MTIF3	Melanogenesis Associated Transcription Factor	metabolismo energético
NDUFA1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha	metabolismo energético
PFKP	Phosphofructokinase	metabolismo energético
SDHA	Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A	metabolismo energético
SLC2A1	Solute Carrier Family 2 Member 1	metabolismo energético
SLC2A3	Solute Carrier Family 2 Member 3	metabolismo energético
SLC2A4	Solute Carrier Family 2 Member 4	metabolismo energético
SLC2A5	Solute Carrier Family 2 Member 5	metabolismo energético
G6PD	Glucose 6 phosphate dehydrogenase	metabolismo energético / glicólise
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	metabolismo energético / glicólise
PGK1	Phosphoglycerate Kinase 1	metabolismo energético / glicólise
BAX	BCL2-Associated X Protein	morte celular
BID	BH3 interacting-domain death agonist	morte celular
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	morte celular
CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	morte celular
ADCY3	Adenylate Cyclase 3	outras funções celulares
ADCY6	Adenylate Cyclase 6	outras funções celulares
ADCY9	Adenylate Cyclase 9	outras funções celulares
AQP3	Aquaporin 3	outras funções celulares
CDH1	cadherin 1	outras funções celulares
GFPT2	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	outras funções celulares
GSK3A	Glycogen Synthase Kinase 3a	outras funções celulares
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	outras funções celulares
NFKB2	Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells 2	outras funções celulares
RGS2	Regulator of G-protein signaling 2	outras funções celulares
MORF4L2	mortality factor 4 like 2	resposta ao estresse
XBPI	X-Box Binding Protein 1	resposta ao estresse
AKR1B1	Aldo-Keto Reductase Family 1, Member B1	resposta ao estresse oxidativo

CAT	Catalase	resposta ao estresse oxidativo
GPX1	Glutathione Peroxidase 1	resposta ao estresse oxidativo
GPX4	Glutathione Peroxidase 4	resposta ao estresse oxidativo
HIF1A	Hypoxia Inducible Factor 1	resposta ao estresse oxidativo
HMOX1	Heme oxygenase	resposta ao estresse oxidativo
HSF1	Heat Shock Transcription Factor 1	resposta ao estresse oxidativo
HSP90AA1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1	resposta ao estresse oxidativo
HSPA1A	Heat Shock Protein A	resposta ao estresse oxidativo
NFE2L2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	resposta ao estresse oxidativo
NOS2	Nitric Oxide Synthase 2	resposta ao estresse oxidativo
PRDX1	Peroxiredoxin-1	resposta ao estresse oxidativo
PRDX3	Peroxiredoxin-3	resposta ao estresse oxidativo
SOD1	Superoxide dismutase 1, soluble	resposta ao estresse oxidativo
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	resposta ao estresse oxidativo

5.3 Avaliação do consumo de glicose no meio de cultura

As concentrações de glicose foram avaliadas no meio de cultura de embriões cultivados individualmente a partir do dia 5 ($n = 106$; mínimo 5 replicatas/grupo). As avaliações foram baseadas em reações enzimáticas com detecção realizada por fluorimetria utilizando o kit Amplex® Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit (Invitrogen™) de acordo as orientações do fabricante.

Em resumo, os meios de cultivo foram diluídos 50 vezes em 1X RB Buffer. Em seguida, uma solução de trabalho foi preparada contendo 100 μ M de Amplex® Red + 0.2U/mL HRP + 2U/mL de glicose oxidase. Para cada amostra ou ponto da curva a reação foi iniciada na proporção 1:1 com a solução de trabalho e permaneceu incubada por 30 min protegida da luz.

Cada reação foi então cuidadosamente transferida em duas alíquotas de 100 μ L para uma microplaca de 96 poços (Greiner Black 96 wells – Round Bottom). A quantificação foi feita através de um fluorímetro onde a leitura foi realizada em Ex.: 530-560nm / Em.: ~590nm. Os resultados foram comparados a uma curva-padrão previamente preparada com uma solução padrão de glicose (100 μ M – 50 μ M – 25 μ M – 12.5 μ M – 6.25 μ M – 0 μ M), e pode ser observada na Figura 3.

Figura 3: Gráfico da curva padrão de glicose construída para este experimento e equação do gráfico utilizada para o cálculo das concentrações em cada amostra

5.4 Avaliação do consumo de piruvato no meio de cultura

As concentrações de piruvato foram avaliadas no meio de cultura de embriões cultivados individualmente a partir do dia 5 ($n = 56$; mínimo 4 replicatas/grupo). Para isto, foi utilizado o kit EnzyChrom™ Pyruvate Assay, que se baseia em uma reação enzimática para a geração de um produto final fluorescente detectável a 585nm. O protocolo utilizado seguiu as orientações propostas pelo fabricante.

Resumidamente, os meios de cultivo foram diluídos 25 vezes em água milli-Q. Em seguida, a solução de trabalho foi preparada contendo 94 μL de Enzyme Mix + 1 μL de Dye reagent por amostra. A reação foi cuidadosamente preparada na proporção 1:9 com a solução de trabalho em uma microplaca de 96 poços (Greiner Black 96 wells – Round Bottom) e permaneceu incubada por 30 minutos protegida da luz.

Finalmente, a quantificação foi feita através de um fluorímetro onde a leitura foi realizada em Ex.: 530nm / Em.: ~585nm. Os resultados foram comparados a uma curva-padrão previamente preparada com uma solução padrão de piruvato de sódio (25 μM – 12,5 μM – 6,25 μM – 3,125 μM - 0 μM), e pode ser observada na Figura 4.

Figura 4: Gráfico da curva padrão de piruvato construída para este experimento e equação do gráfico utilizada para o cálculo das concentrações em cada amostra

5.5 Avaliação da produção de lactato no meio de cultura

As concentrações de lactato foram avaliadas no meio de cultura de embriões cultivados individualmente a partir do dia 5 ($n = 134$; mínimo 7 replicatas por grupo). Para isto, foi utilizado o kit EnzyChrom™ Lactate Assay Kit (Bioassay systems, Califórnia, EUA), que se baseia em uma reação enzimática para a geração de um produto final fluorescente detectável a 585nm. O protocolo utilizado seguiu as orientações propostas pelo fabricante. Em resumo, os meios de cultivo foram diluídos 25 vezes em água milli-Q. Em seguida, uma solução de trabalho foi preparada contendo 40µL de buffer + 1µL de enzima A + 1µL de enzima B + 10µL de NAD + 5µL da probe fluorescente, por amostra. A reação foi cuidadosamente preparada na proporção 1:1 com a solução de trabalho em uma microplaca de 96 poços (Greiner Black 96 wells – Round Bottom) e a leitura foi feita imediatamente em fluorímetro com Ex.: 530nm / Em.: ~585nm. Os resultados foram comparados a uma curva-padrão previamente preparada com uma solução padrão de lactato (40µM – 24µM – 12µM – 0µM) e pode ser observada na Figura 5.

Figura 5: Gráfico mostra a curva padrão de lactato construída para este experimento e equação do gráfico utilizada para o cálculo das concentrações em cada amostra.

5.6 Avaliação do consumo de glutamato no meio de cultura

As concentrações de glutamato foram avaliadas no meio de cultura de embriões cultivados individualmente a partir do dia 5 ($n = 122$; mínimo 7 replicatas/grupo). Para isto, foi utilizado o kit Amplex® Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit (Invitrogen, Califórnia, EUA) que se baseia em uma reação enzimática para a geração de um produto final fluorescente detectável a 585nm. O protocolo utilizado seguiu as orientações propostas pelo fabricante. Resumidamente, os meios de cultivo foram diluídos 25 vezes em 1X RB Buffer. Em seguida, uma solução de trabalho foi preparada contendo 100µM Amplex® Red + HRP 0.25 U/mL + L-glutamato oxidase 0.08 U/mL + L-glutamato-piruvato transaminase 0.5 U/mL + L-alanina 200µM.

Para cada amostra ou ponto da curva a reação foi iniciada na proporção 1:1 com a solução de trabalho e cuidadosamente transferida para uma microplaca de 96 poços (Greiner Black 96 wells – Round Bottom) onde permaneceram incubadas a 37°C por 30 min protegida da luz.

A quantificação foi feita através de um fluorímetro onde a leitura foi realizada em Ex.: 530-560nm / Em.: ~590nm. Os resultados foram comparados a uma curva-padrão previamente preparada com uma solução padrão de glutamato (20µM – 10µM – 5µM – 2.5µM – 0µM), e pode ser observada na Figura 6.

Figura 6: Gráfico mostra a curva padrão de glutamato construída para este experimento e equação do gráfico utilizada para o cálculo das concentrações em cada amostra.

5.7 Avaliação da produção de ATP nos blastocistos

Para a quantificação de ATP, foi utilizado o kit ApoSENSOR™ ADP/ATP Ratio Bioluminescent Assay Kit (BioVision Inc., Milpitas, CA, USA) em pools de 2 blastocistos expandidos por grupo ($n = 46$; mínimo 4 replicatas/grupo). Resumidamente, após 5 minutos em Nucleotide Releasing Buffer, o ATP embrionário foi convertido em luz pela atividade catalisadora da enzima luciferase (ATP Monitoring Enzyme) e a intensidade da luciferina e da luminescência foi medida. Uma curva padrão consistindo de concentrações conhecidas de ATP ($0 \mu\text{M} - 1,25 \mu\text{M} - 2,5 \mu\text{M} - 5 \mu\text{M}$) foi usada para converter a saída de luminescência em concentração de ATP e pode ser observada na Figura 7.

Figura 7: Gráfico mostra a curva padrão de ATP construída para este experimento e equação do gráfico utilizada para o cálculo das concentrações em cada amostra.

5.8 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio

Blastocistos expandidos provenientes do cultivo individual ($n = 147$; mínimo 5 replicatas/grupo) foram coletados no D7 e avaliados quanto ao conteúdo de EROs (CellROX® Green Reagent (CRG) - C10444/Molecular Probes) e o potencial de membrana mitocondrial (MitoTracker® Red CMXRos - M7512/Molecular Probes)].

Os blastocistos foram transferidos individualmente para gotas de 50 µL de PBS contendo CRG (5 µM) + MitoTracker (0,05 µM) e incubados a 38.5 °C em 5% CO₂ e alta umidade por 30 minutos. Os embriões foram então lavados um a um em PBS, transferidos para gotas de paraformaldeído 4% e incubados a 37 °C por mais 10 minutos. Após nova lavagem em PBS, os blastocistos foram posicionados em uma microgota de glicerol em lâminas de vidro e cobertos com lamínula. Em seguida, foram avaliados por microscopia de fluorescência [Leica Microsystems DM16000 B. (MitoTracker – filtro Y3, Ex./Em.: 538–617 nm; EROs – filtro L5, Ex./Em.: 495-519 nm)]. Os blastocistos foram fotografados individualmente em aumento de 40x usando o software Leica Application Suite (LAS).

5.9 Caracterização do perfil lipídico dos blastocistos por MS

Para a caracterização do perfil lipídico dos embriões, os lipídeos foram extraídos e analisados por espectrometria de massas em protocolo descrito pela primeira vez neste trabalho.

5.9.1 Extração de lipídeos – Bligh & Dyer

Em um microtubo contendo um blastocisto expandido (n=90; mínimo 5 replicatas/grupo) foram adicionados 40 μL de água ultrapura e a mistura foi suavemente agitada para promover a lise celular. Em seguida, 50 μL de clorofórmio e 90 μL de metanol foram adicionados e misturados por pipetagem durante 15 segundos (solução de uma fase). Em seguida, adicionaram-se mais 50 μL de CHCl_3 e 50 μL de água ultrapura e as amostras foram incubadas durante 5 min em temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 800 x g durante 60 segundos para melhorar a separação das fases polar e apolar (solução de bifásica). Então, 80 μL da fase apolar (CHCl_3) e 80 μL da fase polar ($\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$) foram combinados em um novo microtubo. Este procedimento foi feito para deixar para trás o precipitado proteico remanescente entre as camadas. As fases orgânica e aquosa combinadas foram secas em um evaporador e as amostras foram seladas a vácuo e armazenadas a -80°C até o momento da análise.

5.9.2 Monitoramento de reações múltiplas (MS)

O MRM é uma função altamente sensível de um espectrômetro de massas do tipo triploquadrupolo, onde o primeiro quadrupolo (Q1) isola um íon precursor de massa (m/z) conhecida. Este íon é então fragmentado no segundo quadrupolo e o terceiro quadrupolo (Q3) é configurado para estabilizar o íon produto e permitir sua passagem para o detector (Figura 8). A combinação do íon precursor e do íon produto é chamada de transição, que é calibrada especificamente para cada composto de interesse. Este processo pode ser feito em milissegundos e gera uma resposta bastante linear, com baixo ruído e alta sensibilidade.

Figura 8: Representação esquemática da interface entre eletroforese capilar e o espectrômetro de massas operando no modo MRM.

Visando a otimização dos resultados devido a baixa quantidade de amostras, este experimento foi realizado em duas etapas. Para a primeira etapa do método, foi montada uma lista de MRMs combinando o m/z para o íon precursor e o íon produto esperado para cada classe (Quadro 2).

Quadro 2: Íons produto e de perda neutra típicos das classes de lipídeos selecionadas.

<i>Classe lipídica</i>	<i>Íon Precursor</i>	<i>Fragmento típico</i>
Fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina (SM)	$[M+H]^+$	m/z 184 (fosforil colina)
Fosfatidiletanolamina (PE)	$[M+H]^+$	Perda neutra de 141 Th (fosforil etanolamina)
Colesterol ésteres (Chol esters)	$[M+H]^+$	m/z 369
Acil-carnitinas	$[M+H]^+$	m/z 85, m/z 60; m/z 144, perda neutra de 59 and 161 Th
Fosfatidilinositol (PI)	$[M+NH_4]^+$	Perda neutra de 277 Th (fosforil inositol + NH_4)
Fosfatidilserina (PS)	$[M+H]^+$	Perda neutra de 185 Th (fosforil serina)
Fosfatidilglicerol (PG)	$[M+NH_4]^+$	Perda neutra de 189 Th (fosforil glicerol + NH_4)
Ceramidas (d18:1; esfingosinas) e Cerebrosídeos	$[M+H]^+$	m/z 264
Ceramidas (d18:0; esfinganinas)	$[M+H]^+$	m/z 266
Ceramidas (d20:1)	$[M+H]^+$	m/z 292
Ceramidas (t18:0; hidroxiesfinganinas)	$[M+H]^+$	m/z 282

Os ácidos graxos livres foram monitorados apenas com base no íon precursor. Já os triacilgliceróis (TAG) foram monitorados com base nos resíduos de ácidos graxos, incluindo

palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), araquídico (C20:0) e araquidônico (C20:4).

Um total de 1.586 transições de MRMs (isômeros constitucionais listados no banco de dados LipidMAPS para 6 subclasses lipídicas [fosfatidilcolinas, esfingomielina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol], além de acil-carnitinas, ésteres de colesterol, ácidos graxos livres e triacilglicerol) foram utilizados para a triagem exploratória de uma amostra representativa composta por um pool de extratos lipídicos de cada grupo experimental. Estas transições foram organizadas em 10 métodos, cada um envolvendo 2 minutos de aquisição de dados, e cada um dos dez métodos examinando um máximo de 200 transições.

Para compor a amostra representativa, uma quantidade de extrato lipídico equivalente a metade de um embrião foi utilizada para cada método criado. Esta amostra foi diluída em ACN + MeOH + 300 mM NH₄Ac 3: 6,65: 0,35 (v/v) e injetada em fluxo (8 µL) no espectrômetro de massas configurado para adquirir dados no modo MRM.

Na segunda etapa, foram selecionadas as transições que resultaram em maior intensidade de íons do que uma amostra utilizada como “branco” (solvente puro). Desta forma, a lista foi reduzida para apenas 383 MRMs de interesse (Apêndice B). Esta mesma lista final foi utilizada para interrogar pelo menos 5 repetições de cada grupo de estudo. Todas as amostras foram entregues à fonte de ionização de um espectrômetro de massa Agilent 6410 QQQ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) utilizando um amostrador automático (G1377A). A bomba capilar conectada ao amostrador operou com um fluxo de 20µL/min e uma pressão de 400 bar. A voltagem no capilar do instrumento foi de 3,5 – 5 kV e o fluxo de gás foi de 5,1 L/min a 300 °C.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

O processamento dos dados extraídos de cada experimento, bem como as análises utilizadas para as devidas comparações entre os grupos de estudo estão descritas a seguir.

6.1 Taxas de produção in vitro de embriões

Ao todo foram realizadas 13 replicatas para coleta dos dados, sendo 4 replicatas para a coleta de embriões para RT-PCR e 9 replicatas para coleta de meios de cultura e de embriões para coloração.

As taxas de clivagem total foram obtidas a partir do número de embriões clivados sobre o número total de presumíveis zigotos colocados no cultivo. Da mesma forma, a proporção de embriões Rápidos e Lentos foi calculada de acordo com a fórmula (n° embriões rápidos ou lentos / n° total de presumíveis zigotos).

Já as taxas de conversão a blastocisto foram calculadas a partir do número de blastocistos totais (Blastocistos iniciais + Blastocistos + Blastocistos expandidos + Blastocistos eclodidos) obtidos nos Dias 7 e 8 sobre o número de embriões clivados rápidos ou lentos.

6.2 Dados de transcrição gênica obtidos por RT-PCR

Para esta análise foram utilizados *pools* de 3 blastocistos por grupo em 4 replicatas. Para a quantificação relativa dos transcritos de interesse, foram utilizados os valores de ΔC_t , calculados a partir da diferença entre os valores de C_t de cada amostra e a média dos valores de C_t dos genes selecionados como controles endógenos (PPIA e GAPDH).

6.3 Avaliações Bioquímicas – consumo de glicose, piruvato e glutamato, produção de lactato e ATP

A concentração de cada um dos metabólitos no meio de cultivo e a quantidade de ATP nos embriões foram obtidas com o auxílio de curva-padrão. Os resultados foram expressos em função da média $\pm$ SEM.

6.4 Avaliações Bioquímicas – potencial de membrana mitocondrial e conteúdo intracelular de EROS

As imagens dos embriões foram analisadas individualmente no software ImageJ (*National Institutes of Health, USA*). Fotos do embrião com e sem os filtros foram sobrepostas para a marcação e mensuração da área total de cada embrião. Em seguida, as fotos obtidas para detecção das sondas são analisadas, com separação dos canais de cor e utilização apenas do canal verde ou vermelho. Nessa imagem, a área de fluorescência é selecionada com o uso da ferramenta de threshold, com o mesmo valor de threshold ($t=30$) sendo usado para todas as imagens dos embriões. As medidas utilizadas são de área, densidade integrada, valor médio, mínimo e máximo de tons de cinza. Após a análise da área de fluorescência demarcada pelo valor de threshold, áreas de background foram selecionadas e medidas.

As medidas utilizadas para a obtenção do valor final de intensidade de fluorescência para cada embrião são: média de tons de cinza da área demarcada pelo threshold (MCT), média de tons de cinza de todos os backgrounds selecionados (MB) e área total do embrião (AT). Para obtenção da intensidade de fluorescência e posterior análise estatística, o seguinte cálculo foi aplicado para os valores obtidos de cada embrião:

Figura 9: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial e da produção de EROs em blastocistos expandidos de bovinos.

$$\text{Intensidade de fluorescência} = (MCT - MB) / AT$$

Em (A) coloração com Hoechst para avaliar número de células (dados não mostrados); (B) potencial de membrana mitocondrial e (C) EROS em blastocistos expandidos de bovinos. Em A, B e C, blastocistos bovinos de desenvolvimento rápido cultivados em 2mM de glicose e a 20% de O_2 .

Os valores de intensidade de fluorescência para cada embrião foram expressos em função da média $\pm$ SEM.

6.5 Dados do perfil lipídico por espectrometria de massas

Os resultados extraídos do espectrômetro de massas foram processados usando um script construído especialmente para obter a intensidade absoluta de cada íon. Em seguida, a leitura de cada amostra foi normalizada de acordo com sua respectiva contagem total de íons. Para melhor entendimento dos resultados, apenas os dados referentes ao perfil de ácidos graxos livres, triacilgliceróis, ésteres de colesterol e carnitinas foram apresentados neste trabalho.

6.6 Análise de agrupamento do dados bioquímicos e moleculares

Por se tratar de um delineamento experimental bastante complexo (fatorial 2x2x3), buscamos ferramentas de análise de dados que pudessem, inicialmente, avaliar todos os parâmetros conjuntamente e fornecer um panorama geral dos efeitos criados pelo sistema. Considerando isto, optamos por uma análise de agrupamento, que pudesse apontar para comportamentos semelhantes entre os grupos de estudo. Sendo assim, os dados dos 12 grupos e 95 caracteres contínuos (incluindo evidências bioquímicas, moleculares e de quantificação relativa de lipídeos) foram normalizados e reunidos em uma única matriz de dados. A matriz foi analisada sob algoritmo de parcimônia, com 500 repetições e Tree-Bisection and Reconnection (TBR) para as buscas heurísticas, usando a opção Traditional Search no software TNT - Tree Analysis Using New Technologies [Goloboff et al., 2000]. Todos os caracteres foram considerados aditivos e igualmente ponderados. Os agrupamentos encontrados foram discutidos com base nos diagramas não-enraizados resultantes e todas as árvores foram criadas através da ferramenta iTol [Letunic & Bork, 2016]. Após cada agrupamento foram identificados os respectivos *nodes* e os principais atributos que contribuíram para cada agrupamento.

Finalmente, cada grupo presente em um dado *cluster* foi comparado com seu respectivo homólogo no *cluster* contrário (p. ex. 0R20 x 0R5) através de análise univariada (teste *t* de Student ou ANOVA com posterior teste de Tukey) para a identificação dos caracteres responsáveis por distinguir os grupos.

7 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da matriz de dados contínuos dos 12 grupos de estudo resultou em uma única árvore ideal, totalmente resolvida (Figura 10).

Figura 10: Diagrama não-enraizado mostrando os clusters formados a partir da análise de parcimônia dos dados contínuos normalizados.

Todo o conjunto de evidências (bioquímicas, moleculares e perfil lipídico) foi considerado. Em (A) árvore indicando a existência de 2 *clusters*: agrupamento dos embriões cultivados em 20% O₂ (vermelho) e agrupamento dos embriões cultivados em 5% O₂ (azul). Em (B), os grupos de 5% O₂ se agrupam em 2 novos *clusters*: grupos rápidos (verde escuro) e lentos (verde claro). Em (C), os grupos de 20% O₂ também se agrupam em 2 *clusters*: grupos cultivados em 0.6 ou 2mM de glicose (rosa claro) e grupos cultivados em 5mM de glicose (rosa escuro).

Nesta análise foi possível verificar que o agrupamento aconteceu majoritariamente de acordo com a tensão de oxigênio em que os embriões foram cultivados (em vermelho, cultivo a 20% O₂ e em azul cultivo a 5% O₂), sugerindo que esta categoria se sobrepõe as demais (glicemia e cinética). Interessantemente, os embriões de cinética lenta cultivados em condições de hiperglicemia (5mM) não foram agrupados em nenhuma das condições.

Levando em conta esta análise inicial, optamos por primeiramente caracterizar os grupos de embriões cultivados em diferentes tensões de oxigênio desconsiderando os grupos lentos cultivados em 5mM de glicose.

Em uma segunda etapa, o fator “tensão de oxigênio” foi isolado e a matriz de evidências foi novamente analisada, resultando em duas novas árvores ideais, totalmente resolvidas, de acordo com a concentração de oxigênio das amostras (5% ou 20%). Os resultados finais foram organizados em 3 análises diferentes, e cada uma será apresentada e discutida separadamente. As comparações feitas entre os grupos de estudo dentro de cada análise estão resumidas no quadro 3.

Quadro 3: Comparações realizadas entre os grupos de estudo dentro dos diferentes clusters indicados pela análise de agrupamento.

20% vs. 5% O ₂	≠ glicoses em 20% O ₂	≠ cinéticas em 5% O ₂
0R20 x 0R5	0R20 x 5R20	0R5 x 0L5
0L20 x 0L5	2R20 x 5R20	2R5 x 2L5
2R20 x 2R5	0L20 x 5L20	5R5 x 5L5
2L20 x 2L5	2L20 x 5L20	
5R20 x 5R5		

As médias dos valores de $1/\Delta Ct$ e o p-valor para cada comparação estão apresentadas nos Apêndices C, D e E.

7.1 Análise 1: Comparação dos grupos cultivados em 20% vs. 5% O₂ (com exceção de 5L20 e 5L5)

As taxas de conversão a blastocisto foram calculadas com base nesta primeira avaliação e estão apresentados no painel 1C. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos cultivados em 5 e 20% de O₂ dentro de uma mesma condição de cinética e glicemia.

Substratos energéticos

Atividade Mitocondrial

Perfil Lipídico

Inicialmente pudemos verificar que, dentre as condições avaliadas, a tensão de oxigênio parece ser aquela que mais impacta em alterações do desenvolvimento embrionário. Estudos realizados com embriões produzidos *in vitro*, incluindo bovinos, em diferentes tensões de oxigênio, indicam que a produção em tensões próximas a fisiológica (5-7% de O₂), resultam em melhor desenvolvimento embrionário, com aumento nas taxas de clivagem e blastocisto, bem como maior taxa de sucesso pós-implantação [Amin et al., 2014; Yoon et al., 2014, Gad et al., 2012]. Além disso, estes mesmo estudos indicaram que exposição a um ambiente mais semelhante ao *in vivo* (5% O₂) ou ao *in vitro* (20% O₂) dá origem a embriões com perfis de transcrição diferentes.

Embora não tenham sido identificadas diferenças significativas nas taxas de clivagem ou de blastocistos entre estes grupos no presente estudo, as análises feitas para avaliar o padrão de transcrição gênica deixam claro que estes embriões possuem, de fato, perfis bastante distintos.

Quando comparamos os embriões dos grupos cultivados em diferentes tensões de oxigênio, podemos observar que aqueles cultivados em 20% de O₂ apresentam, de forma geral, expressão aumentada de um maior número de genes. Estes genes estão envolvidos em vias conhecidas de resposta a estresse, como as vias de resposta ao estresse oxidativo mediadas por **GPX1 e PRDX1** [Ufer and Wang, 2011; Leyens et al., 2004], vias de resposta ao estresse de retículo endoplasmático como as mediadas por *Heat Shock Proteins* (**HSF1 e HSP90**) [Balasubramanian et al., 2007] e maior ativação de cascatas de sinalização pró-apoptóticas (**CASP9, BAX, BID e DDIT3**) [Yoon et al., 2014; Halterman et al., 2010].

Corroborando estes achados, também foi verificado um aumento da produção de EROs nesses grupos (painel 1J), o que já era esperado, pois a exposição a níveis elevados de oxigênio durante o período do cultivo embrionário *in vitro* é uma conhecida fonte de estresse oxidativo [Gad et al., 2012].

Entre os danos causados pelo excesso de EROs, a alteração na expressão de fatores de transcrição deve ser destacada, pois os RNAm e outros tipos de ácidos nucleicos são facilmente danificados por radicais livres, o que pode levar a alterações na maquinaria celular e na síntese proteica [Leese et al., 2008]. Os fatores de transcrição, em geral, atuam em vias que regulam a frequência, taxa e extensão da transcrição do DNA. Assim, reforçando dados de um trabalho recém-publicado pelo grupo que descreve diferenças no controle da transcrição gênica relacionada a tensão de oxigênio [Leite et al., 2017], no presente estudo também observamos padrões distintos de genes responsáveis pelo controle transcricional.

Embriões cultivados a 20% O₂ apresentaram maior transcrição de genes como **REST**, **PAF1**, **Dnmt3a** e **STAT3**, todos já descritos por atuar no controle epigenético e na manutenção do estado de pluripotência celular [Bomfim et al., 2017; Cavadas et al., 2016; Zhang et al., 2013]. Outros fatores de transcrição mais expressos em alta tensão de oxigênio incluem o **KEAP1**, um fator citoprotetor envolvido diretamente na resposta ao estresse oxidativo, **TFAM**, responsável pela estabilidade, manutenção e controle transcricional do DNA mitocondrial [Antelman et al., 2008] e **CDX2**, relacionado com a correta diferenciação do trofotoderma [Bou et al., 2017].

Quando avaliamos o metabolismo os embriões submetidos a alta tensão de oxigênio, estes também parecem estar voltados a maior atividade da via glicolítica, pois encontram-se aumentados os transcritos para transportadores de glicose (**SLC2A1** [*Glut-1*] e **SLC2A5** [*Glut-5*]) e também de enzimas do metabolismo glicolítico como a glicose-6-fosfato-desidrogenase (**G6PD**) e a fosfofrutoquinase (**PFKP**). Em especial nos grupos cultivados em 2mM de glicose, observamos também que há um consumo maior de piruvato (painel 1E), associado a aumento da atividade mitocondrial (grupo 2R20; painel 1H), e mais especificamente no grupo 2L20 ainda há aumento na quantidade de ATP (painel 1I), um indicativo de que o metabolismo destes embriões está efetivamente mais voltado para a produção de energia do que os embriões cultivados em 5% de O₂.

Ainda neste sentido, nos embriões cultivados a 20% O₂, há maior transcrição de genes do metabolismo lipídico como o **ACACA**, fator limitante para a síntese de ácidos graxos; **FASN**, gene relacionado a síntese de palmitato; **SCD**, enzima primariamente envolvida na síntese de ácido oleico [Al Darwich et al., 2010]; **LIPE**, responsável pela mobilização de ácidos graxos a partir dos acilglicerois [Torres et al., 2017]; além de **PPARδ**, que regula o armazenamento de ácidos graxos [Bionaz et al., 2013] e **GPAM**, que catalisa a formação de triacilglicerol e fosfolípidos [Yu et al., 2017], além do **HMGCS1**, que participa em vias de síntese de colesterol [Mazein et al., 2013]. O aumento na transcrição gênica desta via é acompanhado pelo aumento de ácidos graxos livres totais (painel 1K), e em especial, dos ácidos palmítico e esteárico nestes grupos (painel 1L e 1M). Por fim, nos grupos cultivados em 0.6mM de glicose observamos também um aumento de carnitinas (painel 1P).

Tomados conjuntamente, estes dados levam a crer que além da oxidação de carboidratos, a produção de energia também está sendo sustentada pelo metabolismo de ácidos graxos pela beta-oxidação. Este mecanismo já foi previamente sugerido como sendo responsável por dar suporte ao aumento da demanda energética para a blastulação e eclosão

[Sudano et al., 2016], ao mesmo tempo que favorece o equilíbrio do sistema redox e contribui para a síntese de biomassa [Krisner and Prather, 2012].

Entretanto, é importante ressaltar que este maior “empenho” em produzir energia pelos embriões cultivados em 20% O₂ provavelmente está relacionado com a ruptura do metabolismo silencioso, demonstrando que as condições do ambiente podem influenciar a ativação de genes e refletir um metabolismo perturbado [Fernandez-Gonzalez et al., 2009 e Smith et al., 2009]. Assim, se considerarmos que não houve diferença na taxa de conversão a blastocisto entre grupos cultivados em diferentes tensões de oxigênio, acreditamos na hipótese de que a maior expressão gênica está relacionada a uma resposta adaptativa. Desta forma, apesar de os embriões serem bastante suscetíveis aos efeitos de uma elevada concentração de oxigênio, um metabolismo mais ativo os ajudaria a reparar os danos causados por injúrias ambientais, reestabelecendo uma trajetória de desenvolvimento normal.

Nos embriões cultivados a 5% O₂, em relação ao metabolismo lipídico, houve alterações principalmente no grupo 0L5, onde foi observada maior expressão de **ACSL1**, **ELOVL6** e **FADS2**, genes que já foram previamente descritos em vias de síntese e alongamento de ácidos graxos em blastocistos [Sudano et al., 2016]. A expressão aumentada destes genes se reflete também na maior quantidade de TAG e ésteres de colesterol encontrada em todos os grupos cultivados a 5% O₂ (painel 1N e 1O).

Ainda em relação ao metabolismo de lipídeos, outro fator encontrado nos grupos de 5% e que está diretamente relacionado a condição de baixa tensão de O₂, foi a maior quantidade relativa de palmitoil-carnitina (painel 1Q), um dos fatores limitantes para a beta-oxidação. Sabe-se em situação de injúria isquêmica/hipóxica, a palmitoil-carnitina se acumula membrana mitocondrial e, devido as suas propriedades físico-químicas, atua na dinâmica molecular da membrana podendo levar a danos [Portilla et al., 1997]. Portanto, hipotetizamos que o redirecionar o metabolismo para a síntese e armazenamento de lipídeos como os TAG e o colesterol ao invés de utilizá-los para a produção de energia pode representar uma resposta protetora dos embriões na tentativa de evitar danos mitocondriais. Corroborando esta hipótese, observamos um maior consumo de glicose nos grupos 0R5 e 0L5 (painel 1D), além de maior produção de lactato (painel 1F), maior atividade mitocondrial e maior quantidade de ATP no grupo 0R5 (painel 1H e 1I), indicando que ou o suprimento energético pode ser assegurado por outras vias, ou que o gasto energético com mecanismos de reparo é menor nos embriões destes grupos quando comparados aos homólogos a 20% O₂.

Por fim, em comparação com os grupos cultivados a 20% O₂, os grupos em 5% O₂ tiveram maior expressão de genes relacionados a crescimento (**IGFBP2**) e diferenciação celular (**NANOG** e **POU5F1**), além do **MORF4L2**, que está envolvido com a regulação positiva da transcrição e com o sistema de reparos do DNA [Chen et al., 2010].

Os resultados obtidos nesta análise inicial, ilustram a resposta do genoma embrionário a condição de estresse oxidativo e revelam como os embriões podem ter um metabolismo comprometido, especialmente os que sobrevivem ao estresse. Ainda não está claro, porém, se um metabolismo hiper-regulado tem como consequência níveis elevados de danos ao DNA, ou se a presença de níveis significativos de dano impulsionam um aumento no metabolismo e na demanda energética devido aos mecanismos de reparo.

Figura 11: Conclusões parciais obtidas das comparações entre grupos cultivados em diferentes tensões de oxigênio.

7.2 Análise 2: Comparação dos grupos com diferentes cinéticas de desenvolvimento em 5% O₂

A análise da matriz considerando apenas os grupos cultivados a 5% de oxigênio resultou em uma única árvore ideal, totalmente resolvida (painel 2A). As taxas de conversão a blastocisto foram também calculadas com base nesta avaliação e estão apresentadas no painel 2C. Para todas as concentrações de glicose, os embriões rápidos cultivados em 5% de oxigênio tiveram maior conversão a blastocisto do que os embriões lentos.

Substratos energéticos

Atividade Mitochondrial

Perfil Lipídico

Diversos estudos anteriores realizados por este grupo demonstraram haver diferenças importantes no transcriptoma, no metaboloma e no perfil de metilação do DNA de embriões que se desenvolvem com diferentes cinéticas de clivagem [Milazzotto et al., 2016; Silva et al., 2016, Ispada et al., 2018].

No presente estudo, 25 genes apresentaram alterações no padrão relativo de transcrição entre Rápidos e Lentos. Ao avaliarmos mais atentamente a expressão destes genes, alguns pontos chamam a atenção, como por exemplo o fato de que, quando os embriões são cultivados em baixa tensão de oxigênio, a maioria dos genes avaliados possuem comparativamente maior quantidade de transcritos nos grupos de cinética lenta do que nos rápidos.

Sugerimos anteriormente que quando submetidos a estímulos estressores no ambiente, alguns embriões exibem um metabolismo mais ativo, o que ajudaria a restaurar a sua trajetória normal de desenvolvimento. Entretanto, se a exposição a condições não otimizadas persistir por tempo suficiente ou se a desregulação metabólica for suficientemente grave, pode haver perda embrionária ou interferências relevantes no desenvolvimento, com possíveis efeitos a longo prazo [Leese et al., 2008]. De fato, os embriões dos grupos Lentos cultivados a 5% parecem ter um metabolismo mais ativo, que é refletido no aumento da transcrição gênica de vias importantes para o desenvolvimento pré-implantacional.

Mais especificamente, foi observada a maior expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose (**SLC2A4**, **PFKP** e **SDHA**), acompanhado de maior produção de lactato no grupo 2L5, indicando um desvio para a via da glicólise aeróbica. Este fenômeno já foi descrito anteriormente em ambientes com baixa tensão de oxigênio onde a oxidação do piruvato pode ser restrita devido a regulação negativa da atividade da enzima piruvato desidrogenase induzida pela hipóxia [Gardner, 2015]. Além disso, já foi demonstrada uma relação inversa entre o consumo de glicose e a concentração de oxigênio, ou seja, quanto menor a quantidade de O₂, mais elevado o metabolismo glicolítico e a produção de lactato que, apesar de ser uma via energeticamente desfavorável, garante que o ‘braço’ biosintético da via da pentose-fosfato tenha a maior quantidade possível de substratos disponíveis [Gardner and Harvey, 2015].

Entretanto, para que o metabolismo da glicose possa ser direcionado para a glicólise aeróbica, o embrião dependeria de outras fontes de energia, como a oxidação de ácidos graxos para suprir a necessidade de ATP [Krisher and Prather, 2012]. De fato, nos grupos 2L5 e 5L5, observamos maior expressão de **ACACA**, **ACSL6** e **FASN** genes envolvidos no metabolismo

de ácidos graxos. Todavia, a hiper-regulação de genes da via glicolítica e do metabolismo lipídico em embriões lentos não se traduz em produção maior produção de ATP, uma vez que maiores quantidades deste foi encontrada apenas no grupo 2R5 (painel 2I). Como já citado anteriormente, nossa hipótese é de que o metabolismo mais ativo apresentado pelos embriões lentos também trás um gasto energético muito elevado para sustentar os mecanismos de reparo do genoma, transcriptoma e proteoma, como proposto por Leese et al., 2007.

Ainda com relação ao metabolismo de lipídeos, o grupo 0L5 apresentou maiores quantidades para os transcritos dos genes **GPAM** e **PPAR δ** , ambos envolvidos em via de síntese de lipídeos de cadeia longa, resultado consistente com a maior quantidade relativa de TAGs encontradas neste grupo (painel 2N).

Além disso, os embriões lentos também expressaram genes relacionados a resposta ao estresse (**ATF4**, **CAT**, **HSP90**, **KEAP1**, **MORF4L2** e **PRDX1**) e a sinalização da cascata pró-apoptótica (**CASP9** e **BID**). Desta forma, ao avaliarmos os dados conjuntamente, concluímos que parece haver um limiar muito tênue que separa dois tipos de embriões com altas taxas metabólicas: (i) de um lado está um grupo de embriões com um certo grau de dano, mas que consegue ativar vias adaptativas e sobreviver, mesmo que com qualidade reduzida e futuras implicações; (ii) do outro lado estão os embriões que mostram maior atividade devido a perda do controle transcricional.

Sendo assim, acreditamos na hipótese de que embriões lentos cultivados a 5% de O₂ pertencem a este segundo grupo, uma vez que apesar de apresentarem um metabolismo mais ativo, as taxas de conversão a blastocisto foram menores nos grupos quando comparados aos grupos rápidos em todas as concentrações de glicose. Dados de outro estudo prévio do grupo com embriões de diferentes cinéticas mostram que o DNA de blastocistos lentos está significativamente menos metilado do que o DNA de blastocistos rápidos [Ispada et al., 2018]. Embora ainda necessitem de comprovação, estes resultados nos levam a crer que a perda do controle transcricional e a menor capacidade de ativação de vias adaptativas dos embriões lentos pode estar relacionadas a mecanismos epigenéticos.

Mais ainda, o cultivo de embriões em 5% de oxigênio em condições de hipo ou normoglicemia, associado a seleção daqueles de cinética rápida quando das primeiras clivagens pode levar a geração de embriões mais semelhantes a fisiologia normal *in vivo* e, portanto, com maior sucesso reprodutivo.

Figura 12: Conclusões parciais obtidas das comparações entre grupos Rápidos e Lentos cultivados em 5% de oxigênio

7.3 Análise 3: Comparação dos grupos cultivados com diferentes suplementações de glicose em 20% O₂

Muitos estudos já estabeleceram uma relação entre a glicose e a diminuição da viabilidade durante o desenvolvimento embrionário inicial. Por um lado, exposição a concentrações elevadas de glicose durante as primeiras clivagens foi correlacionada com o bloqueio do desenvolvimento no estágio de ativação do genoma embrionário e com a baixa qualidade dos blastocistos [Gardner et al., 2000; Cagnone et al., 2012]. Por outro lado, estudos já demonstraram que embriões mais viáveis utilizam mais oxigênio e mais glicose do que embriões menos competentes [Lopes et al., 2007].

No presente estudo, as diferentes suplementações de glicose foram oferecidas ao embrião cerca de 80 horas após o início do cultivo (dia 3), justamente quando sabe-se que há um aumento considerável do consumo de glicose e oxigênio para ajudar na compactação da mórula e, posteriormente, sustentar a formação e manutenção da blastocle e a necessidade de precursores biossintéticos como os lipídeos, que são utilizados para a construção de membranas e proliferação celular.

A análise de agrupamentos indicou a separação principalmente em função da diferença entre os grupos cultivados em 0.6 e 2mM (hipo e normoglicemia) e os grupos cultivados em condição de hiperglicemia (5mM) (painel 3A). Além disso, esta análise evidenciou que quando cultivados em 20% O₂, a quantidade de glicose no meio de cultura é mais importante para definir alterações no embrião do que a cinética. No entanto, embora a cinética fique em segundo plano, foi possível observar diferenças interessantes no perfil de

resposta ao estresse metabólico entre os grupos rápidos e lentos, que também serão discutidas a seguir.

Substratos energéticos

Atividade Mitochondrial

Perfil Lipídico

Ao avaliarmos os resultados deste estudo, alguns fatos chamam a atenção: (i) quanto maior a quantidade de glicose ofertada aos embriões, também maior foi o seu consumo; (ii) em concentrações mais próximas da fisiológica de glicose, parece haver um favorecimento do metabolismo lipídico e (iii) os efeitos observados na transcrição gênica e nas taxas de conversão a blastocisto são mais extensos nos embriões de cinética lenta.

A princípio, o aumento da internalização de glicose pode ser considerado bom para o desenvolvimento e um potencial marcador de viabilidade do embrião, como anteriormente descrito em embriões de outras espécies [Lee et al., 2015]. Entretanto, parece haver um limiar ideal para que o consumo de glicose não se torne prejudicial. De fato, o que observamos é que embora o influxo de glicose tenha sido maior nos grupos cultivados a 5mM (painel 3D), os embriões nesta situação parecem não responder adequadamente a este estímulo, uma vez que este aumento não foi convertido em maior produção de ATP ou lactato (painel 3I e 3F). Com base nestas observações, é possível especular que a exposição a alta concentração de glicose no meio de cultura pode resultar em falhas nos mecanismos de produção de energia do embrião, como sugerido por Uhde et al., 2018.

Corroborando esta hipótese, os embriões cultivados em 0.6 ou 2mM, apesar de consumirem menos glicose do que os grupos cultivados em 5mM, demonstraram ter um metabolismo energético mais eficiente, uma vez que a expressão de genes relacionados ao metabolismo glicolítico (**PFKP**, **ACAT1** e **ATP5L**) está aumentada, assim como sua atividade mitocondrial e concentração de ATP (no grupo 2R20, painel 3H e 3I).

Além disso, os embriões o grupo 0R20 também possuem menores quantidades relativas de ácidos graxos livres do que o grupo 5R20 (painel 3K) e maiores quantidades de carnitinas, assim como o grupo 2R20 (painel 3P). Apesar de os genes do metabolismo de lipídico não apresentarem diferenças nestas comparações, o perfil de lipídeos encontrado nestes grupos é um forte indicativo de que estes embriões estão também utilizando vias de oxidação de ácidos graxos. Mais ainda, o aumento na oxidação de lipídeos acoplado a uma menor avidez pelo consumo de glicose é um mecanismo de geração de energia conhecido e comumente utilizado por células tumorais para garantir sua rápida proliferação e sua sobrevivência [Fadaka et al., 2017]. Já foi sugerido que este mesmo mecanismo seria utilizado no controle metabólico pelas células do blastocisto [Krisher and Prather, 2012].

Finalmente, sabe-se que a exposição a um ambiente hiperglicêmico já foi relacionada a menores taxas de sobrevivência e também com a desregulação da expressão gênica

[Cagnone et al., 2012]. Entretanto, observamos que este não é um efeito generalizado e é particularmente predominante em embriões de cinética lenta.

Dentro de uma mesma condição de cinética, não foram encontradas diferenças significativas nos índices de conversão a blastocisto entre os grupos cultivados com suplementação de glicose distintas. No entanto, os grupos 0L20 e 5L20 tiveram taxas de blastocisto cerca de duas vezes menores do que os respectivos grupos de embriões rápidos. Associado a isto, os embriões lentos apresentaram um maior número de genes hiperexpressos envolvidos nas diferentes vias avaliadas. Assim como ocorreu com os embriões lentos cultivados em 5% O₂, este aumento geral da transcrição de genes parece ser resultado de um descontrole dos mecanismos epigenéticos.

Corroborando esta hipótese, dos 20 genes que tiveram maior expressão relativa nos grupos lentos (0L20, 2L20 e 5L20), 6 estão relacionados com fatores de controle da transcrição gênica e epigenética (**ATF4**, **Dnmt3a**, **Dnmt3b**, **DDIT3**, **H3F3B**, **TFAM**) e 3 genes estão relacionados a diferenciação celular (**POU5F1**, **CDX2** e **NANOG**). Como mencionado anteriormente, embriões lentos possuem menos metilação do DNA do que os embriões rápidos [Ispada et al., 2018], portanto, acreditamos que o aumento da expressão destes genes pode estar relacionado com uma tentativa de reverter possíveis falhas na onda de metilação durante a reprogramação epigenética e também com a manutenção do estado de pluripotência nestes grupos.

Em resumo, diversos estudos já demonstraram a relevância do metabolismo energético para o controle da expressão gênica, uma vez que as células constantemente ajustam seu estado metabólico em resposta à sinalização extracelular e/ou disponibilidade de nutrientes [Vander Heiden et al., 2009]. Sendo assim, um fator de estresse como a alta concentração de oxigênio por si só seria capaz de impactar o metabolismo e o desenvolvimento. Associado a isto, o ambiente nutricional ao qual o embrião é exposto durante o desenvolvimento inicial é capaz de alterar seu padrão de reprogramação epigenética e o processo de diferenciação celular. Portanto, a presença de um segundo fator estressor como a alta quantidade de glicose no meio de cultura, pode, a longo ou curto prazo, trazer consequências profundas tanto para o desenvolvimento inicial quanto para a saúde da prole.

Figura 13: Conclusões parciais obtidas das comparações entre cultivados em diferentes concentrações de glicose em 20% de oxigênio.

8 CONCLUSÃO

É importante ressaltar que optamos por utilizar uma estratégia metodológica que nos fornecesse um panorama geral dos dados a partir de uma análise simples e que englobasse as variáveis como um todo, e ao mesmo tempo permitisse a identificação de características biologicamente significativas. Assim, realizamos a caracterização da resposta bioquímica e molecular de embriões submetidos a diferentes condições de estresse no cultivo *in vitro*, levando em conta a cinética de desenvolvimento das primeiras clivagens. Os principais resultados observados podem ser resumidos em:

1. O controle metabólico do blastocisto é mediado fortemente pela concentração de oxigênio extracelular.
2. Quando cultivados em tensão de oxigênio semelhante a fisiológica (5%), a cinética do desenvolvimento inicial é mais importante para determinar a resposta metabólica do que a suplementação de glicose.
 - a. Com um metabolismo mais ativo, possivelmente devido a perda do controle epigenético, somado a uma produção de energia ineficiente, embriões lentos são mais susceptíveis e não conseguem superar os danos causados pelo estresse, por menor que ele seja.
 - b. Embriões rápidos produzem energia de modo mais eficiente e conseguem se desenvolver ao estágio de blastocisto sem sobrecarregar o metabolismo.
3. Quando cultivados em alta tensão de oxigênio (20%), a suplementação de glicose no meio de cultura é mais determinante para a resposta embrionária do que a cinética.
 - a. Em condições mais fisiológicas de glicose, os embriões rápidos sofrem com o estresse ambiental e metabólico, mas são capazes de ativar vias adaptativas e mecanismos de resposta para reparar os danos e chegar ao estágio de blastocisto.
 - b. Parece haver um limiar tolerável de glicose no meio de cultura. Assim, embriões cultivados em hiperglicemia, em especial os de cinética lenta, parecem não responder ao estresse metabólico, comprometendo o desenvolvimento e a viabilidade.

9 FUTUROS PASSOS

Refletindo sua notável resiliência, o embrião é capaz de se desenvolver mesmo quando as condições de cultura não favorecem o metabolismo, como por exemplo na presença de uma combinação de fatores estressores no sistema. Mas embora o embrião possa se adaptar às mudanças ambientais e aos diferentes níveis de nutrientes (a chamada plasticidade), esta adaptação acarreta em um custo alto em termos de viabilidade.

Acreditamos assim, que o foco dos próximos estudos, deve estar na formulação de um sistema de cultivo menos estático, que seja capaz de mimetizar a dinâmica do trato reprodutivo, fortalecendo as características metabólicas de um embrião mais viável, ao mesmo tempo que ajuda a recuperar embriões que estariam destinados a falhar.

Para isso, baseando-se nos resultados deste trabalho, um bom ponto de partida seria realizar o cultivo de embriões de diferentes cinéticas em 5% de oxigênio, utilizando concentrações menores de glicose para favorecer o metabolismo de embriões rápidos e realizando a modulação de vias epigenéticas na tentativa de melhorar o desempenho e viabilidade de embriões lentos.

BIBLIOGRAFIA

AGARWAL, Ashok et al. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and sterility**, v. 86, n. 3, p. 503-512, 2006.

AL DARWICH, Abdulrahman et al. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 93, n. 1-2, p. 30-36, 2010.

ALUKAL, Joseph P.; LIPSHULTZ, Larry I. Safety of assisted reproduction, assessed by risk of abnormalities in children born after use of in vitro fertilization techniques. **Nature Reviews Urology**, v. 5, n. 3, p. 140, 2008.

AMIN, Ahmed et al. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. **Molecular reproduction and development**, v. 81, n. 6, p. 497-513, 2014.

ANNES, Kelly et al. Effective individual culture system for in vitro production of bovine embryos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.(Online)**, v. 54, n. 3, p. 209-214, 2017.

ANTELMAN, J. et al. Expression of mitochondrial transcription factor A (TFAM) during porcine gametogenesis and preimplantation embryo development. **Journal of cellular physiology**, v. 217, n. 2, p. 529-543, 2008.

APARICIO, B.; CRUZ, M.; MESEGUER, M. Is morphokinetic analysis the answer?. **Reproductive biomedicine online**, v. 27, n. 6, p. 654-663, 2013.

BAILLET, Adrienne; MANDON-PEPIN, Béatrice. Mammalian ovary differentiation—a focus on female meiosis. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 356, n. 1-2, p. 13-23, 2012.

BALASUBRAMANIAN, S. et al. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 265-275, 2007.

BÁNHÉGYI, Gábor et al. Endoplasmic reticulum stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1113, n. 1, p. 58-71, 2007.

BIONAZ, Massimo et al. Functional role of PPARs in ruminants: Potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. **PPAR research**, v. 2013, 2013.

BOMFIM, Monalisa M. et al. Antioxidant responses and deregulation of epigenetic writers and erasers link oxidative stress and DNA methylation in bovine blastocysts. **Molecular reproduction and development**, v. 84, n. 12, p. 1296-1305, 2017.

BOU, Gerelchimeg et al. CDX2 is essential for cell proliferation and polarity in porcine blastocysts. **Development**, p. dev. 141085, 2017.

BURTON, Graham J.; JAUNIAUX, Eric. Oxidative stress. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011.

CAGNONE, Gaël LM et al. Differential gene expression profile in bovine blastocysts resulting from hyperglycemia exposure during early cleavage stages. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 2, p. 50, 1-12, 2012.

CAGNONE, Gael LM; SIRARD, Marc-Andre. The embryonic stress response to in vitro culture: insight from genomic analysis. **Reproduction**, p. REP-16-0391, 2016.

CAGNONE, Gael LM; SIRARD, Marc-André. Transcriptomic signature to oxidative stress exposure at the time of embryonic genome activation in bovine blastocysts. **Molecular reproduction and development**, v. 80, n. 4, p. 297-314, 2013.

CAIRNS, Rob A.; HARRIS, Isaac S.; MAK, Tak W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85, 2011.

CAVADAS, Miguel AS et al. REST is a hypoxia-responsive transcriptional repressor. **Scientific reports**, v. 6, p. 31355, 2016.

CHASON, Rebecca J. et al. Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 10, p. 412-420, 2011.

CHEN, Meizhen; TOMINAGA, Kaoru; PEREIRA-SMITH, Olivia M. Emerging role of the MORF/MRG gene family in various biological processes, including aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1197, n. 1, p. 134-141, 2010.

DOS SANTOS, Érika Cristina et al. Noninvasive characterization of metabolites secreted in culture media by bovine embryos during in vitro production. **Metabolomics**, v. 12, n. 5, p. 94, 2016.

ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FADAKA, Adewale et al. Biology of glucose metabolism in cancer cells. **Journal of Oncological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 45-51, 2017.

FARIN, Peter W.; PIEDRAHITA, Jorge A.; FARIN, Charlotte E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 178-191, 2006.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, Raúl et al. Analysis of gene transcription alterations at the blastocyst stage related to the long-term consequences of in vitro culture in mice. **Reproduction**, v. 137, n. 2, p. 271-283, 2009.

GAD, Ahmed et al. Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 4, 2012.

GARDNER, David K. et al. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. **Human reproduction**, v. 26, n. 8, p. 1981-1986, 2011.

GARDNER, David K. Lactate production by the mammalian blastocyst: manipulating the microenvironment for uterine implantation and invasion?. **Bioessays**, v. 37, n. 4, p. 364-371, 2015.

GARDNER, David K.; HARVEY, Alexandra J. Blastocyst metabolism. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 4, p. 638-654, 2015.

GARDNER, David K.; LANE, Mark W.; LANE, Michelle. EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 57, n. 3, p. 256-261, 2000.

GOLOBOFF, Pablo; FARRIS, Steve; NIXON, Kevin. TNT (Tree analysis using New Technology). 2000.

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

GUPTA, Sajal et al. The role of oxidative stress and antioxidants in assisted reproduction. **Current Women's Health Reviews**, v. 6, n. 3, p. 227-238, 2010.

HALL, V. et al. Early embryonic development, assisted reproductive technologies, and pluripotent stem cell biology in domestic mammals. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 128-142, 2013.

HALTERMAN, Marc W. et al. The ER stress response factor, chop-10, protects against hypoxia-induced neuronal death. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M109. 095299, 2010.

HAMATANI, Toshio et al. Global gene expression profiling of preimplantation embryos. **Human cell**, v. 19, n. 3, p. 98-117, 2006.

HANSEN, Peter. Survival vs. death pathways in the thermally-stressed preimplantation embryo. In: **BIOLOGY OF REPRODUCTION**. 1603 MONROE ST, MADISON, WI 53711-2021 USA: SOC STUDY REPRODUCTION, 2008. p. 277-277.

HARDING, Heather P. et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Molecular cell**, v. 11, n. 3, p. 619-633, 2003.

HARVEY, Alexandra J.; KIND, Karen L.; THOMPSON, Jeremy G. REDOX regulation of early embryo development. **Reproduction**, v. 123, n. 4, p. 479-486, 2002.

HUGENTOBLE, S. A. et al. Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 75, n. 3, p. 496-503, 2008.

ISPADA, Jessica et al. Genome-wide screening of DNA methylation in bovine blastocysts with different kinetics of development. **Epigenetics & chromatin**, v. 11, n. 1, p. 1, 2018.

KRISHER, Rebecca L.; PRATHER, Randall S. A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: metabolic modification to support rapid cell proliferation. **Molecular reproduction and development**, v. 79, n. 5, p. 311-320, 2012.

LEE, Y. S. L.; THOUAS, G. A.; GARDNER, D. K. Developmental kinetics of cleavage stage mouse embryos are related to their subsequent carbohydrate and amino acid utilization at the blastocyst stage. **Human reproduction**, v. 30, n. 3, p. 543-552, 2015.

LEESE, Henry J. et al. Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. **Human Reproduction**, v. 22, n. 12, p. 3047-3050, 2007.

LEESE, Henry J. et al. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. **Molecular human reproduction**, v. 14, n. 12, p. 667-672, 2008.

LEESE, Henry J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. **Bioessays**, v. 24, n. 9, p. 845-849, 2002.

LEITE, Roberta Ferreira et al. Oxidative stress alters the profile of transcription factors related to early development on in vitro produced embryos. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W242-W245, 2016.

LEYENS, Gregory; KNOOPS, Bernard; DONNAY, Isabelle. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 69, n. 3, p. 243-251, 2004.

LONERGAN, P. et al. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression—experience from animal studies. **Reproductive biomedicine online**, v. 7, n. 6, p. 657-663, 2003.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos—dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 17-22, 2008.

LONERGAN, Patrick; FAIR, Trudee. Maturation of oocytes in vitro. **Annual review of animal biosciences**, v. 4, p. 255-268, 2016.

LOPES, A. S. et al. Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. **Human Reproduction**, v. 22, n. 2, p. 558-566, 2006.

MAZEIN, Alexander et al. A comprehensive machine-readable view of the mammalian cholesterol biosynthesis pathway. **Biochemical pharmacology**, v. 86, n. 1, p. 56-66, 2013.

MILAZZOTTO, Marcella Pecora et al. Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. **Molecular reproduction and development**, v. 83, n. 4, p. 324-336, 2016.

MOLEY, K. H. et al. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. **Nature medicine**, v. 4, n. 12, p. 1421, 1998.

OHLWEILER, L. U. et al. Intracytoplasmic sperm injection improves in vitro embryo production from poor quality bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 778-783, 2013.

PARRISH, J. J. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of reproduction**, v. 38, n. 5, p. 1171-1180, 1988.

PORTILLA, Didier. Carnitine palmitoyl-transferase enzyme inhibition protects proximal tubules during hypoxia. **Kidney international**, v. 52, n. 2, p. 429-437, 1997.

RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; SCHELLANDER, K.; LEWIN, H. A. Biological interpretations of transcriptomic profiles in mammalian oocytes and embryos. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 129-139, 2008.

ROLLO, C. et al. Histone 3 lysine 9 acetylation is a biomarker of the effects of culture on zygotes. **Reproduction**, v. 154, n. 4, p. 375-385, 2017.

SILVA, T. et al. Morphokinetic-related response to stress in individually cultured bovine embryos. **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1308-1317, 2016.

SMITH, Sadie L. et al. Gene expression profiling of single bovine embryos uncovers significant effects of in vitro maturation, fertilization and culture. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 76, n. 1, p. 38-47, 2009.

SUDANO, Mateus J. et al. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro-and in vivo-produced blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 8, p. 1129-1141, 2014.

SUDANO, Mateus J. et al. Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 472-484. e1, 2016.

SUTTON-MCDOWALL, Melanie L. et al. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1632-1641, 2012.

TAKAHASHI, Masashi. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 1, p. 1-9, 2012.

TORRES, V. et al. Resveratrol–cyclodextrin complex affects the expression of genes associated with lipid metabolism in bovine in vitro produced embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, 2018.

UFER, Christoph; WANG, Chi Chiu. The roles of glutathione peroxidases during embryo development. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 4, p. 12, 2011.

UHDE, Karen et al. Exposure to elevated glucose concentrations alters the metabolomic profile of bovine blastocysts. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0199310, 2018.

VAJTA, Gabor et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: The Well of the Well (WOW) system. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 55, n. 3, p. 256-264, 2000.

VAN HOECK, V. et al. Interaction between differential gene expression profile and phenotype in bovine blastocysts originating from oocytes exposed to elevated non-esterified fatty acid concentrations. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 2, p. 372-384, 2015.

VANDER HEIDEN, Matthew G.; CANTLEY, Lewis C.; THOMPSON, Craig B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **science**, v. 324, n. 5930, p. 1029-1033, 2009.

VIGNEAULT, Christian et al. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1701-1709, 2004.

VIGNEAULT, Christian et al. Unveiling the bovine embryo transcriptome during the maternal-to-embryonic transition. **Reproduction**, v. 137, n. 2, p. 245-257, 2009.

VIUFF, Dorthe et al. Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2–5 post-insemination. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 4, p. 1143-1148, 2000.

WANG, Cun et al. Clusterin protects hepatocellular carcinoma cells from endoplasmic reticulum stress induced apoptosis through GRP78. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e55981, 2013.

YOON, Seung-Bin et al. Developmental competence of bovine early embryos depends on the coupled response between oxidative and endoplasmic reticulum stress. **Biology of reproduction**, v. 90, n. 5, 2014.

YU, Haibin et al. Bovine lipid metabolism related gene GPAM: Molecular characterization, function identification, and association analysis with fat deposition traits. **Gene**, v. 609, p. 9-18, 2017.

ZERNICKA-GOETZ, Magdalena; MORRIS, Samantha A.; BRUCE, Alexander W. Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 7, p. 467, 2009.

ZHANG, Kun; HAVERSAT, Jocelyn M.; MAGER, Jesse. CTR9/PAF1c regulates molecular lineage identity, histone H3K36 trimethylation and genomic imprinting during preimplantation development. *Developmental biology*, v. 383, n. 1, p. 15-27, 2013.

Ministério da Agricultura, Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>, acessado em 28/08/2014.

Ministério da Agricultura. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes%20-%20versao%20atualizada.pdf, acessado em 28/08/2014.

ANEXO A

PBS

Reagentes	Fabricante	Catálogo	2L
NaCl	Sigma	S-5886	9,9g
KCl	Sigma	P-5405	0,25347g
NaH ₂ PO ₄	Sigma	S-0876	1,43976g
KH ₂ PO ₄	Sigma	P-5655	2,449g

Meio de Lavagem (Pré-MIV)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Volume
TCM-199 (com HEPES)	Gibco	12380-028	4.5mL
Soro Fetal Bovino 10%	Gibco	16140-014	0.5mL
Piruvato 0.2mM	Sigma	P-4562	10µL
Gentamicina 50µg/mL	Sigma	G-1264	25µL

Filtrar em membrana 0.22µm

Meio de Maturação (MIV)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	Volume
TCM-199 (com bicarbonato)	Gibco	12380-028	4.5mL
Soro Fetal Bovino 10%	Gibco	16140-014	0.5mL
Piruvato 0.2mM	Sigma	P-4562	10µL
Gentamicina 50µg/mL	Sigma	G-1264	25µL
FSH 0.5µg/mL	Bioniche	Folltropin -V	5µL
hCG 7UI/mL	Intervet	Chorulon	50µL

Filtrar em membrana 0.22µm

Estradiol 1µg/mL	Sigma	E-4389	5µL
------------------	-------	--------	-----

Soluções Estoque para Fertilização *in vitro* (FIV)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	TL STOCK (50mL)	TL SÊMEN (50mL)
NaCl	Sigma	S-5886	0.3330g	0.2910g
KCl	Sigma	P-5405	0.0120g	0.0115g
MgCL ₂	Sigma	M-2393	0.0050g	0.0040g
NaH ₂ PO ₄	Sigma	S-0876	0.00205g	0.00175g
NaHCO ₃	Sigma	S-8875	0,1050g	0.1050g
CaCL ₂ H ₂ O	Sigma	C-5670	0,0150g	0.0150g
Ác. Lático syr.	Sigma	L-7900	71,5mL	155mL
HEPES	Sigma	H-0891	****	0.1190g
pH = 7.4				

Meio de Fertilização (FIV)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	p/ 10mL
TL - Stock			10mL
BSA - Livre de ácidos graxos	Sigma	A-7511	0,060g
Piruvato 0.2mM	Sigma	P-4562	20µL
Gentamicina 50µg/mL	Sigma	G-1264	50µL

Filtrar em membrana 0.22µm

Meio de Fertilização para gotas (FIV Gotas)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	p/ 4mL
Meio FIV			3.640µL
Heparina	Sigma	H-9399	40µL
PHE			160µL

Filtrar em membrana 0.22µm

Percoll®

Percolzinho	90%
Solução de Percoll	0.9mL
Solução 10X	0.1mL
CaCl ₂ 2H ₂ O 1M (0,7350g/5mL de água milli-Q)	2mL
MgCl ₂ 6H ₂ O 0.1M (0,1015g/5mL de água milli-Q)	3.9mL
Ácido Lático (Lactado de Na)	3.7mL
NaHCO ₃	0.0021g

* Para fazer o Percoll 45%, diluir 300µL de Percoll 90% em 300µL de TL sêmen.

Meio de Cultivo (SOF Estoque)

Reagentes	Fabricante	Catálogo	p/ 100mL
NaCl	Sigma	S-5886	0,6294g
KCl	Sigma	P-5405	0,0534g
KH ₂ PO ₄	Sigma	P-5655	0,0162g
NaHCO ₃	Sigma	S-5761	0,2106g
Na Lactato	Sigma	L-7900	0,0370g
Ácido Pirúvico	Sigma	P-3662	0,0034g
L-glutamina	Sigma	G-8540	0,0146g
MgCl ₂ 7H ₂ O	Sigma	M-2393	0,0098g
CaCl ₂	Sigma	C-5670	0,0252g

Filtrar em membrana 0.22µm

Meio de Cultivo (SOFaa) – 0.2mM de Glicose

Reagentes	Fabricante	Catálogo	p/ 5mL
Meio SOF estoque			4.6mL
Aminoácidos essenciais	Sigma	M-5550	0.100mL
Aminoácidos não essenciais	Sigma	M-7145	0.050mL
Soro Fetal Bovino	Gibco	16140-014	0.250mL
Filtrar em membrana 0.22µm			

APÊNDICE A

Sistema de atmosfera controlada – Câmara de 5% O₂

- Passar silicone na rosca da câmara e rosquear com cuidado até o final;
- Abrir a tampa e colocar sobre a mesma cerca de 3 mL a 5 mL de água milli Q;
- Colocar a tampa de uma placa de Petri grande, virada para baixo, para servir de base para as placas com os embriões;
- Colocar as placas com os embriões no meio de cultura CIV sobre a tampa;
- Fechar a câmara rosqueando com cuidado;
- O gás usado é uma mistura de 90% Nitrogênio, 5% Oxigênio e 5% Gás carbônico (com laudo);
- Inserir o tubo do gás em um dos orifícios e deixar o gás fluir por cerca de 1 minuto para que o ar do interior saia e seja substituído pela mistura de gás;
- Fechar o orifício livre com uma das tampas de silicone até vedar bem;
- Continuar inserindo o gás por cerca de 30 segundos e fechar a segunda rolha de silicone, vedando totalmente o sistema;
- A câmara é então mantida na incubadora a 38,5°C.

Figura 2: Desenho esquemático da câmara utilizada para manutenção da tensão de 5% de O₂.

APÊNDICE B

Método completo contendo as 383 transições de MRM utilizadas para avaliar os grupos. As transições estão organizadas de acordo com a classe lipídica.

<i>Compound Name</i>	<i>Precursor Ion</i>	<i>Product Ion</i>
PC (30:0)	706,5	184,1
PC (30:1)	704,5	184,1
PC (30:2)	702,5	184,1
PC (32:0)	734,6	184,1
PC (32:2)	730,5	184,1
PC (32:3)	728,5	184,1
PC (34:0)	762,6	184,1
PC (34:1)	760,6	184,1
PC (34:2)	758,6	184,1
PC (34:3)	756,6	184,1
PC (34:4)	754,5	184,1
PC (34:5)	752,5	184,1
PC (36:0)	790,6	184,1
PC (36:1)	788,6	184,1
PC (36:2)	786,6	184,1
PC (36:3)	784,6	184,1
PC (36:4)	782,6	184,1
PC (36:5)	780,6	184,1
PC (36:8)	774,5	184,1
PC (38:0)	818,7	184,1
PC (38:1)	816,6	184,1
PC (38:2)	814,6	184,1
PC (38:3)	812,6	184,1
PC (38:4)	810,6	184,1
PC (38:5)	808,6	184,1
PC (38:6)	806,6	184,1
PC (38:7)	804,6	184,1
PC (40:0)	846,7	184,1
PC (40:5)	836,6	184,1
PCo (32:1)	718,6	184,1
PCo (32:2)	716,6	184,1
PCo (32:3)	714,5	184,1
PCo (34:1)	746,6	184,1
PCo (34:2)	744,6	184,1
PCo (34:3)	742,6	184,1
PCo (36:2)	772,6	184,1

PCo (36:3)	770,6	184,1
PCo (36:4)	768,6	184,1
PCo (36:5)	766,6	184,1
PCo (38:5)	794,6	184,1
PCo (38:6)	792,6	184,1
PCo (40:6)	820,6	184,1
PCo (42:6)	848,7	184,1
PCo (34:0)	748,6	184,1
PCo (36:0)	776,7	184,1
PCo (36:1)	774,6	184,1
PCo (38:0)	804,7	184,1
PCo (38:4)	796,6	184,1
PCp (40:6)	818,6	184,1
PCp (42:6)	846,6	184,1
PCp (36:5)	764,6	184,1
SM (d16:1/18:1)	701,6	184,1
SM (d16:1/22:1)	757,6	184,1
SM (d16:1/24:0)	787,7	184,1
SM (d16:1/24:1)	785,6	184,1
SM (d18:0/16:0)	705,6	184,1
SM (d18:0/18:0)	733,6	184,1
SM (d18:0/20:0)	761,6	184,1
SM (d18:0/22:0)	789,7	184,1
SM (d18:0/24:0)	817,7	184,1
SM (d18:1/14:0)	675,5	184,1
SM (d18:1/16:0)	703,6	184,1
SM (d18:1/18:0)	731,6	184,1
SM (d18:1/18:1)9Z))	729,6	184,1
SM (d18:1/20:0)	759,6	184,1
SM (d18:1/24:0)	815,7	184,1
SM (d18:1/24:1 (15Z))	813,7	184,1
SM (d18:2/22:1)	783,6	184,1
SM (d18:2/24:1)	811,7	184,1
PE (18:1)	482,3	341,3
PE (20:1)	508,3	367,3
PE (20:4)	502,3	361,3
PE (22:4)	530,3	389,3
PE (32:1)	690,5	549,5
PE (34:0)	720,6	579,6
PE (34:1)	718,5	577,5
PE (34:2)	716,5	575,5
PE (36:0)	748,6	607,6
PE (36:1)	746,6	605,6
PE (36:2)	744,6	603,6
PE (36:3)	742,5	601,5

PE (36:4)	740,5	599,5
PE (36:5)	738,5	597,5
PE (36:8)	732,5	591,5
PE (38:3)	770,6	629,6
PE (38:4)	768,6	627,6
PE (38:5)	766,5	625,5
PE (38:6)	764,5	623,5
PE (38:9)	758,5	617,5
PE (40:1)	774,6	633,6
PE (40:2)	772,6	631,6
PE (40:4)	796,6	655,6
PE (40:5)	794,6	653,6
PE (40:6)	792,6	651,6
PE (40:7)	790,5	649,5
PEo (34:1)	704,6	563,6
PEo (34:2)	702,5	561,5
PEo (36:1)	732,6	591,6
PEo (36:2)	730,6	589,6
PEo (36:3)	728,6	587,6
PEo (36:5)	724,5	583,5
PEo (38:2)	758,6	617,6
PEo (38:4)	754,6	613,6
PEo (38:5)	752,6	611,6
PEo (38:6)	750,5	609,5
PEo (40:0)	790,7	649,7
PEo (40:5)	780,6	639,6
PEp (36:6)	748,5	607,5
PEp (40:7)	774,5	633,5
PG (16:0)	516,3	327,3
PG (18:0)	530,3	341,3
PG (20:0)	558,4	369,4
PG (22:0)	586,4	397,4
PG (22:6)	574,3	385,3
PG (24:0)	628,4	439,4
PG (26:0)	656,4	467,4
PG (32:0)	740,5	551,5
PG (34:0)	768,5	579,5
PG (34:1)	766,5	577,5
PG (34:2)	764,5	575,5
PG (36:1)	794,6	605,6
PG (36:2)	792,5	603,5
PG (36:3)	790,5	601,5
PG (36:4)	788,5	599,5
PG (36:8)	780,5	591,5
PG (38:3)	818,6	629,6

PG (38:4)	816,5	627,5
PG (40:0)	852,6	663,6
PGo (18:0)	516,3	327,3
PGo (20:0)	544,4	355,4
PGp (20:0)	542,4	353,4
PGp (38:6)	796,5	607,5
PI (14:1)	560,3	283,3
PI (20:5)	636,3	359,3
PI (34:1)	854,5	577,5
PI (34:2)	852,5	575,5
PI (36:1)	882,6	605,6
PI (36:2)	880,6	603,6
PI (36:3)	878,5	601,5
PI (36:4)	876,5	599,5
PI (38:2)	908,6	631,6
PI (38:3)	906,6	629,6
PI (38:4)	904,6	627,6
PI (38:5)	902,5	625,5
PI (38:7)	898,5	621,5
PI (40:0)	940,7	663,7
PI (40:10)	920,5	643,5
PI (40:4)	932,6	655,6
PI (40:5)	930,6	653,6
PI (40:6)	928,6	651,6
PIo (38:2)	894,6	617,6
PIo (40:3)	920,6	643,6
PIo (40:4)	918,6	641,6
PIp (38:1)	894,6	617,6
PIp (40:2)	920,6	643,6
PIp (42:6)	940,6	663,6
PS (14:1)	468,2	283,2
PS (16:0)	512,3	327,3
PS (28:0)	680,4	495,4
PS (28:1)	678,4	493,4
PS (30:2)	704,4	519,4
PS (32:2)	732,5	547,5
PS (36:1)	790,6	605,6
PS (36:2)	788,5	603,5
PS (36:8)	776,4	591,4
PS (38:0)	820,6	635,6
PS (38:1)	818,6	633,6
PS (38:2)	816,6	631,6
PS (38:4)	812,5	627,5
PS (38:7)	806,5	621,5
PS (40:0)	848,6	663,6

PS (40:4)	840,6	655,6
PSo (16:0)	484,3	299,3
PSo (18:0)	512,3	327,3
PSo (20:0)	540,4	355,4
PSo (38:0)	806,6	621,6
PSp (16:0)	482,3	297,3
PSp (40:6)	820,5	635,5
PSp (42:6)	848,6	663,6
2-ethylacryloylcarnitine, Tiglylcarnitine	244,1	83,1
(2E)-hexenedioylcarnitine, O-octanoylcarnitine	288,1	85,1
Decanoylcarnitine	316,2	85,1
O-(11-carboxyundecanoyl)carnitine	374,2	60,1
2-Hydroxymyristoylcarnitine, 3-hydroxytetradecanoylcarnitine	388,3	60,1
(7Z,10Z)-hexadecadienoylcarnitine	396,3	85,1
Palmitoylcarnitine, (5Z)-13-carboxytridec-5-enoylcarnitine	400,3	60,1
O-(13-carboxytridecanoyl)carnitine	402,3	60,1
3-hydroxypalmitoleoylcarnitine, Heptadecanoyl carnitine	414,3	60,1
Stearidonyl carnitine	420,3	60,1
Linoelaidyl carnitine, O-linoleoylcarnitine, 9,12-Hexadecadienylcarnitine	424,3	85,1
O-oleoylcarnitine, Elaidic carnitine	426,4	60,1
Stearoylcarnitine, hexadecanedioic acid mono-L-carnitine ester	428,4	60,1
(9Z,12Z,15Z)-3-hydroxyoctadecatrienoylcarnitine	438,3	85,1
3-hydroxylinoleoylcarnitine,	440,3	85,1
(9Z)-3-hydroxyoctadecenoylcarnitine	442,3	60,1
12-Hydroxy-12-octadecanoylcarnitine, 3-hydroxyoctadecanoylcarnitine	444,4	60,1
O-arachidonoylcarnitine	448,3	85,1
(11Z)-eicoseneoylcarnitine	454,4	85,1
Arachidyl carnitine, O-[(9Z)-17-carboxyheptadec-9-enoyl]carnitine	456,4	60,1
O-(17-carboxyheptadecanoyl)carnitine	458,3	60,1
3-hydroxyarachidonoylcarnitine	464,3	60,1
Docosa-4,7,10,13,16-pentaenoyl carnitine, Clupanodonyl carnitine	474,4	60,1
(7Z,10Z,13Z,16Z)-docosatetraenoylcarnitine	476,4	60,1
O-behenoylcarnitine	484,4	85,1
12:0 Cholesteryl ester	586,5	369,1
14:1 Cholesteryl ester	612,5	369,1
14:0 Cholesteryl ester	614,6	369,1
15:1 Cholesteryl ester	626,6	369,1
15:0 Cholesteryl ester	628,6	369,1
16:3 Cholesteryl ester	636,5	369,1
16:2 Cholesteryl ester, zymosteryl palmitoleate	638,6	369,1

16:1 Cholesteryl ester	640,6	369,1
16:0 Cholesteryl ester	642,6	369,1
16:3 Campesteryl ester	650,6	369,1
16:2 Campesteryl ester	652,6	369,1
16:1 Campesteryl ester	654,6	369,1
16:0 Campesteryl ester	656,6	369,1
16:3 Stigmasteryl ester	662,6	369,1
18:3 Cholesteryl ester, 16:2 Stigmasteryl ester, 16:3 Sitosteryl ester	664,6	369,1
18:2 Cholesteryl ester, zymosteryl oleate, 16:1 Stigmasteryl ester, 16:2 Sitosteryl ester	666,6	369,1
18:1 Cholesteryl ester, 16:0 Stigmasteryl ester, 16:1 Sitosteryl ester	668,6	369,1
18:0 Cholesteryl ester, 16:0 Sitosteryl ester	670,6	369,1
18:3 Campesteryl ester	678,6	369,1
lanosteryl palmitoleate, 18:2 Campesteryl ester	680,6	369,1
18:1 Campesteryl ester	682,6	369,1
18:0 Campesteryl ester	684,6	369,1
20:5 Cholesteryl ester	688,6	369,1
20:4 Cholesteryl ester, 18:3 Stigmasteryl ester	690,6	369,1
20:3 Cholesteryl ester, 18:2 Stigmasteryl ester, 18:3 Sitosteryl ester	692,6	369,1
20:2 Cholesteryl ester, 18:1 Stigmasteryl ester, 18:2 Sitosteryl ester	694,6	369,1
20:1 Cholesteryl ester, 18:0 Stigmasteryl ester, 18:1 Sitosteryl ester	696,6	369,1
20:0 Cholesteryl ester, 18:0 Sitosteryl ester	698,6	369,1
20:3 Campesteryl ester	706,6	369,1
lanosteryl oleate, 20:2 Campesteryl ester	708,6	369,1
20:1 Campesteryl ester	710,6	369,1
Cholesteryl nitrolinoleate	711,6	369,1
20:0 Campesteryl ester	712,7	369,1
22:6 Cholesteryl ester	714,6	369,1
22:5 Cholesteryl ester	716,6	369,1
22:4 Cholesteryl ester, 20:3 Stigmasteryl ester	718,6	369,1
Ecdysone palmitate, 22:3 Cholesteryl ester, 20:2 Stigmasteryl ester, 20:3 Sitosteryl ester	720,5	369,1
Cholesteryl 11-hydroperoxy-eicosatetraenoate, 22:2 Cholesteryl ester, 20:1 Stigmasteryl ester, 20:2 Sitosteryl ester	722,6	369,1
22:1 Cholesteryl ester, 20:0 Stigmasteryl ester, 20:1 Sitosteryl ester	724,7	369,1
22:0 Cholesteryl ester, 20:0 Sitosteryl ester	726,7	369,1
22:3 Campesteryl ester	734,6	369,1
22:2 Campesteryl ester	736,7	369,1

22:1 Campesteryl ester	738,7	369,1
22:0 Campesteryl ester	740,7	369,1
22:3 Stigmasteryl ester	746,6	369,1
22:2 Stigmasteryl ester, 22:3 Sitosteryl ester	748,7	369,1
22:1 Stigmasteryl ester, 22:2 Sitosteryl ester	750,7	369,1
24:1 Cholesteryl ester, 22:0 Stigmasteryl ester, 22:1 Sitosteryl ester	752,7	369,1
22:0 Sitosteryl ester	754,7	369,1
C12:0	199,2	199,2
C12:1	197,2	197,2
C14:0	227,3	227,3
C14:1	225,2	225,2
C16:0	255,3	255,3
C16:1	253,3	253,3
C18:0	283,3	283,3
C18:1	281,3	281,3
C18:2	279,3	279,3
C18:3	277,3	277,3
C18:4	275,3	275,3
C20:0	311,3	311,3
C20:1	309,3	309,3
C20:3	305,3	305,3
C20:4	303,3	303,3
C20:5	301,3	301,3
C22:0	339,3	339,3
C22:1	337,3	337,3
C22:4	331,3	331,3
C22:5	329,3	329,3
C22:6	327,3	327,3
C24:0	367,3	367,3
C24:1	365,3	365,3
C24:5	353,3	353,3
C24:6	355,3	355,3
C26:0	395,3	395,3
C26:1	393,3	393,3
C28:0	423,4	423,4
C30:0	451,4	451,4
C32:0	479,4	479,4
C34:0	507,5	507,5
TAG(48:2)_FA16:0	820,8	547,8
TAG(48:2)_FA16:1	820,8	549,8
TAG(48:2)_FA18:1	820,8	521,8
TAG(48:2)_FA18:2	820,8	523,8
TAG(48:1)_FA16:0	822,8	549,8
TAG(48:1)_FA16:1	822,8	551,8

TAG(48:1)_FA18:1	822,8	523,8
TAG(48:0)_FA16:0	824,8	551,8
TAG(48:0)_FA16:0	824,8	523,8
TAG(50:3)_FA16:0	846,8	573,8
TAG(50:3)_FA16:1	846,8	575,8
TAG(50:3)_FA18:1	846,8	547,8
TAG(50:3)_FA18:2	846,8	549,8
TAG(50:2)_FA16:0	848,8	575,8
TAG(50:2)_FA16:1	848,8	577,8
TAG(50:2)_FA18:1	848,8	549,8
TAG(50:2)_FA18:2	848,8	551,8
TAG(50:1)_FA16:0	850,8	577,8
TAG(50:1)_FA16:1	850,8	579,8
TAG(50:1)_FA18:0	850,8	549,8
TAG(50:1)_FA18:1	850,8	551,8
TAG(50:0)_FA16:0	852,8	579,8
TAG(50:0)_FA18:0	852,8	551,8
TAG(51:7)_FA18:1	852,8	553,8
TAG(52:4)_FA16:0	872,8	599,8
TAG(52:4)_FA18:1	872,8	573,8
TAG(52:4)_FA18:2	872,8	575,8
TAG(52:4)_FA20:4	872,8	551,8
TAG(52:3)_FA16:0	874,8	601,8
TAG(52:3)_FA16:1	874,8	603,8
TAG(52:3)_FA18:1	874,8	575,8
TAG(52:3)_FA18:2	874,8	577,8
TAG(52:2)_FA16:0	876,8	603,8
TAG(52:2)_FA16:1	876,8	605,8
TAG(52:2)_FA18:0	876,8	575,8
TAG(52:2)_FA18:1	876,8	577,8
TAG(52:2)_FA18:2	876,8	579,8
TAG(52:1)_FA16:0	878,8	605,8
TAG(52:1)_FA18:0	878,8	577,8
TAG(52:1)_FA18:1	878,8	579,8
TAG(52:0)_FA16:0	880,8	607,8
TAG(52:0)_FA18:0	880,8	579,8
TAG(53:7)_FA18:1	880,8	581,8
TAG(54:8)_FA18:1	892,7	593,7
TAG(54:5)_FA16:0	898,8	625,8
TAG(54:5)_FA18:1	898,8	599,8
TAG(54:5)_FA18:2	898,8	601,8
TAG(54:5)_FA20:4	898,8	577,8
TAG(54:4)_FA16:0	900,8	627,8
TAG(54:4)_FA18:1	900,8	601,8
TAG(54:4)_FA18:2	900,8	603,8

TAG(54:4)_FA20:4	900,8	579,8
TAG(54:3)_FA16:0	902,8	629,8
TAG(54:3)_FA18:0	902,8	601,8
TAG(54:3)_FA18:1	902,8	603,8
TAG(54:3)_FA18:2	902,8	605,8
TAG(54:2)_FA16:0	904,8	631,8
TAG(54:2)_FA18:0	904,8	603,8
TAG(54:2)_FA18:1	904,8	605,8
TAG(54:2)_FA18:2	904,8	607,8
TAG(54:1)_FA16:0	906,8	633,8
TAG(54:1)_FA18:0	906,8	605,8
TAG(54:1)_FA18:1	906,8	607,8
TAG(56:8)_FA18:1	920,8	621,8
TAG(56:6)_FA18:1	924,8	625,8
TAG(56:6)_FA20:4	924,8	603,8
TAG(56:5)_FA16:0	926,8	653,8
TAG(56:5)_FA18:1	926,8	627,8
TAG(56:5)_FA18:2	926,8	629,8
TAG(56:4)_FA16:0	928,8	655,8
TAG(56:3)_FA18:1	930,8	631,8
TAG(56:3)_FA18:2	930,8	633,8
TAG(58:7)_FA20:0	950,8	621,8
TAG(58:6)_FA18:1	952,8	653,8
TAG(58:5)_FA18:1	954,8	655,8
TAG(58:2)_FA18:1	960,9	661,9
TAG(58:2)_FA18:2	960,9	663,9
TAG(58:1)_FA18:1	962,9	663,9
TAG(59:7)_FA16:1	964,9	693,9
TAG(60:4)_FA20:4	984,9	663,9
TAG(60:0)_20:0	992,9	663,9
TAG(49:7)_FA18:2	824,8	527,8
TAG(52:5)_FA20:4	870,8	549,8
TAG(54:8)_FA18:0	892,7	591,7
TAG(54:0)_FA18:0	908,9	607,9
TAG(56:8)_FA16:1	920,8	649,8
TAG_18:2_27	926,8	627,8
TAG_18:2_29	930,8	631,8
TAG(57:8)_FA18:2	934,9	637,9
TAG(56:1)_FA20:0	934,9	605,9
TAG(57:7)_FA18:1	936,9	637,9
TAG(57:7)_FA18:2	936,9	639,9
TAG(58:8)_FA20:0	948,8	619,8
TAG(58:3)_FA18:1	958,9	659,9
TAG(60:9)_FA18:1	974,9	675,9
TAG(60:7)_FA18:1	978,9	679,9

TAG(60:4)_FA18:1	984,9	685,9
TAG(60:2)_FA18:1	988,9	689,9
TAG(60:2)_FA20:0	988,9	659,9

APÊNDICE C

Dados de expressão gênica da comparação dos grupos cultivados em 20% x 5% O₂. As tabelas mostram os valores da média de $1/\Delta Ct$ calculados para cada grupo de estudo e os valores de p para cada comparação. Em destaque os genes que apresentaram significância ou tendência estatística (*p<0,07).

	0R20	0R5	P value
ACACA	0,289	0,252	0,075
ACAT1	0,239	0,239	0,976
ACSL1	0,173	0,192	0,068
ACSL3	0,293	0,405	0,139
ACSL6	0,381	0,361	0,677
ADCY3	0,147	0,122	0,114
ADCY6	0,102	0,109	0,509
ADCY9	0,136	0,139	0,631
AKR1B1	0,568	0,817	0,117
AQP3	0,875	0,831	0,810
ATF4	0,313	0,519	0,015
ATP5L	-4,427	4,305	0,003*
BAX	0,695	0,681	0,932
BID	0,166	0,177	0,179
BMP15	0,125	0,127	0,893
CASP3	0,121	0,149	0,207
CASP9	0,228	0,193	0,013*
CAT	0,236	0,268	0,139
CDH1	1,441	1,238	0,553
CDX2	0,400	0,313	0,121
CPT1B	0,090	0,094	0,492
CPT2	0,211	0,205	0,635
DDIT3	0,203	0,207	0,752
Dnmt1	0,187	0,180	0,491
Dnmt3A	1,589	0,912	0,047*
Dnmt3B	0,523	0,452	0,335
EGFR	0,218	0,209	0,621
ELOVL6	0,297	0,523	0,030*
FADS2	0,226	0,321	0,049*
FASN	0,610	0,553	0,660
G6PD	0,460	0,573	0,091
GFPT2	0,177	0,171	0,743
GPAM	0,144	0,157	0,399
GPX1	1,571	0,728	0,019*
GPX4	0,466	0,355	0,143
GSK3A	0,400	0,371	0,589
H3F3A	0,230	0,254	0,458
H3F3B	0,232	0,265	0,382
HDAC2	0,187	0,184	0,904
HIF1A	0,121	0,144	0,333
HMGCS1	0,666	0,715	0,763

HMOX1	0,242	0,300	0,228
HPRT1	0,235	0,248	0,579
HSF1	0,347	0,285	0,026*
HSP90AA1	-0,902	-3,547	0,005*
HSPA1A	0,167	0,179	0,617
IGF1R	0,199	0,195	0,812
IGFBP2	-1,655	2,476	0,009*
IGFBP4	0,152	0,151	0,863
KEAP1	0,273	0,255	0,317
LIPE	0,093	0,100	0,423
MORF4L2	0,143	0,192	0,076
MTIF3	0,131	0,122	0,347
NANOG	0,172	0,200	0,038*
NDUFA1	0,248	0,277	0,399
NFE2L2	0,149	0,186	0,288
NFkB2	0,163	0,200	0,133
NOS2	0,165	0,151	0,187
PAF1	0,265	0,262	0,839
PFKP	0,163	0,135	0,181
PGK1	0,292	0,296	0,823
POU5F1	-1,675	4,617	0,042
PPARA	0,104	0,107	0,818
PPARG	0,104	0,094	0,044*
PPARGC1A	0,093	0,099	0,516
PRDX1	-1,276	-2,899	0,091
PRDX3	0,187	0,172	0,272
REST	0,155	0,130	0,014*
RGS2	0,124	0,121	0,826
SCD	0,323	0,310	0,759
SDHA	0,370	0,328	0,321
SLC2A1	1,019	0,784	0,365
SLC2A3	0,464	0,581	0,266
SLC2A4	0,126	0,138	0,499
SLC2A5	1,624	0,982	0,244
SOD1	0,298	0,315	0,560
SOD2	0,209	0,190	0,292
SREBF1	0,140	0,135	0,733
STAT3	0,346	0,284	0,024*
TFAM	0,192	0,183	0,526
XBP1	0,293	0,283	0,663

	0L20	0L5	P value
ACACA	0,247	0,309	0,086
ACAT1	0,234	0,206	0,123
ACSL1	0,182	0,213	0,147
ACSL3	0,444	0,320	0,003*
ACSL6	0,376	0,354	0,630
ADCY6	0,131	0,134	0,901
ADCY9	0,140	0,133	0,271

AKR1B1	1,321	0,656	0,384
AQP3	0,651	0,786	0,465
ATF4	0,559	0,454	0,339
ATP5L	-3,879	-4,708	0,877
BAX	0,742	0,650	0,569
BID	0,176	0,203	0,096
BMP15	0,120	0,155	0,193
CASP9	0,221	0,310	0,027*
CAT	0,258	0,283	0,567
CDH1	1,978	1,361	0,360
CDX2	0,400	0,337	0,166
CPT2	0,224	0,193	0,238
DDIT3	0,253	0,325	0,164
Dnmt1	0,186	0,187	0,950
Dnmt3A	1,219	0,880	0,293
Dnmt3B	0,496	0,412	0,435
EGFR	0,224	0,193	0,411
ELOVL6	0,431	0,245	0,075
FADS2	0,281	0,205	0,145
FASN	0,725	0,525	0,147
G6PD	0,497	0,650	0,483
GFPT2	0,180	0,176	0,912
GPAM	0,174	0,183	0,163
GPX1	1,123	1,511	0,645
GPX4	0,440	0,545	0,436
GSK3A	0,517	1,195	0,320
H3F3A	0,240	0,219	0,292
H3F3B	0,245	0,224	0,527
HDAC2	0,179	0,182	0,868
HIF1A	0,135	0,136	0,962
HMGCS1	0,523	0,428	0,425
HMOX1	0,274	0,344	0,421
HPRT1	0,207	0,223	0,674
HSF1	0,375	0,513	0,304
HSP90AA1	-1,069	-0,750	0,314
HSPA1A	0,189	0,178	0,748
IGF1R	0,198	0,199	0,968
IGFBP2	-2,903	-5,851	0,841
IGFBP4	0,174	0,173	0,980
KEAP1	0,256	0,246	0,682
MORF4L2	0,191	0,207	0,477
MTIF3	0,136	0,131	0,481
NANOG	0,215	0,194	0,685
NDUFA1	0,221	0,185	0,293
NFE2L2	0,165	0,159	0,838
NFkB2	0,186	0,193	0,601
NOS2	0,157	0,215	0,059*
PAF1	0,266	0,299	0,422
PFKP	0,133	0,248	0,013*
PGK1	0,294	0,294	1,000

POU5F1	-3,143	-0,736	0,148
PPARA	0,097	0,164	0,344
PRDX1	-1,490	-1,156	0,495
PRDX3	0,189	0,200	0,494
REST	0,133	0,156	0,111
RGS2	0,103	0,164	0,002*
SCD	0,293	0,292	0,985
SDHA	0,312	0,281	0,598
SLC2A1	0,753	0,780	0,916
SLC2A3	0,454	0,369	0,481
SLC2A4	0,132	0,148	0,394
SLC2A5	1,594	1,403	0,741
SOD1	0,282	0,310	0,470
SOD2	0,196	0,196	0,991
SREBF1	0,155	0,119	0,404
STAT3	0,329	0,354	0,717
TFAM	0,188	0,233	0,028*
XBP1	0,293	0,281	0,863

	2R20	2R5	P value
ACACA	0,277	0,203	0,012*
ACAT1	0,171	0,211	0,144
ACSL1	0,195	0,174	0,074
ACSL3	0,388	0,360	0,466
ACSL6	0,395	0,274	0,013*
ADCY6	0,118	0,115	0,887
ADCY9	0,151	0,132	0,187
AKR1B1	0,871	0,737	0,346
AQP3	0,756	0,502	0,053*
ATF4	0,485	0,585	0,449
ATP5L	-2,258	-7,241	0,299
BAX	0,606	0,580	0,862
BID	0,190	0,174	0,194
BMP15	0,131	0,108	0,351
CASP3	0,136	0,141	0,538
CASP9	0,307	0,186	0,001*
CAT	0,225	0,220	0,786
CDH1	1,205	0,858	0,052*
CDX2	0,443	0,318	0,116
CPT2	0,188	0,193	0,827
DDIT3	0,321	0,202	0,000*
Dnmt1	0,169	0,161	0,512
Dnmt3A	1,573	0,743	0,033*
Dnmt3B	0,578	0,474	0,306
EGFR	0,241	0,205	0,092
ELOVL6	0,305	0,376	0,487
FADS2	0,207	0,280	0,001*
FASN	0,576	0,573	0,985
G6PD	0,798	0,410	0,015*

GFPT2	0,160	0,152	0,657
GPAM	0,177	0,151	0,018*
GPX1	1,223	0,625	0,021*
GPX4	0,567	0,438	0,179
GSK3A	0,499	0,394	0,307
H3F3A	0,221	0,257	0,262
H3F3B	0,209	0,222	0,539
HDAC2	0,130	0,159	0,172
HIF1A	0,117	0,144	0,099
HMGCS1	0,448	0,625	0,242
HMOX1	0,329	0,316	0,786
HPRT1	0,199	0,205	0,828
HSE1	0,424	0,317	0,032*
HSP90AA1	-0,742	-1,574	0,083
HSPA1A	0,174	0,182	0,683
IGF1R	0,191	0,188	0,882
IGFBP2	-3,322	1,454	0,171
IGFBP4	0,180	0,154	0,114
KEAP1	0,295	0,238	0,001*
MORF4L2	0,181	0,194	0,462
MTIF3	0,114	0,122	0,419
NANOG	0,231	0,184	0,058*
NDUFA1	0,234	0,233	0,984
NFE2L2	0,171	0,165	0,725
NFkB2	0,202	0,191	0,225
NOS2	0,186	0,167	0,396
PAF1	0,305	0,239	0,031
PFKP	0,205	0,139	0,001*
PGK1	0,288	0,263	0,300
POU5F1	-2,027	8,834	0,184
PPARG	0,125	0,105	0,211
PPARGC1A	0,120	0,089	0,000*
PRDX1	-1,274	-3,416	0,102
PRDX3	0,191	0,175	0,258
REST	0,153	0,137	0,216
RGS2	0,122	0,098	0,011*
SCD	0,368	0,285	0,028*
SDHA	0,334	0,277	0,173
SLC2A1	0,752	0,584	0,301
SLC2A3	0,386	0,402	0,842
SLC2A4	0,127	0,134	0,696
SLC2A5	1,265	1,289	0,957
SOD1	0,328	0,272	0,240
SOD2	0,204	0,172	0,225
SREBF1	0,160	0,166	0,710
STAT3	0,299	0,252	0,452
TFAM	0,225	0,185	0,068*
XBP1	0,289	0,272	0,694

	2L20	2L5	P value
ACACA	0,265	0,245	0,258
ACAT1	0,203	0,220	0,096
ACSL1	0,182	0,170	0,404
ACSL3	0,428	0,339	0,136
ACSL6	0,399	0,335	0,005*
ADCY6	0,115	0,132	0,063*
ADCY9	0,159	0,143	0,015*
AKR1B1	0,858	0,853	0,981
AQP3	0,665	0,729	0,686
ATF4	0,455	0,456	0,987
ATP5L	-1,368	46,062	0,017*
BAX	1,088	0,593	0,012*
BID	0,172	0,168	0,767
BMP15	0,123	0,116	0,756
CASP3	0,132	0,141	0,195
CASP9	0,218	0,206	0,337
CAT	0,243	0,255	0,601
CDH1	1,257	1,251	0,977
CDX2	0,409	0,331	0,027*
CPT2	0,207	0,208	0,959
DDIT3	0,365	0,213	0,008
Dnmt1	0,196	0,191	0,297
Dnmt3A	1,489	0,848	0,073
Dnmt3B	0,473	0,458	0,767
EGFR	0,215	0,198	0,201
ELOVL6	0,382	0,398	0,895
FADS2	0,321	0,277	0,075
FASN	0,733	0,514	0,023*
G6PD	0,488	0,540	0,674
GFPT2	0,152	0,170	0,143
GPAM	0,132	0,171	0,109
GPX1	0,951	0,703	0,402
GPX4	0,503	0,460	0,677
GSK3A	0,423	0,354	0,480
H3F3A	0,213	0,239	0,414
H3F3B	0,232	0,227	0,867
HDAC2	0,167	0,177	0,599
HIF1A	0,135	0,144	0,475
HMGCS1	0,892	0,589	0,122
HMOX1	0,237	0,355	0,052*
HPRT1	0,223	0,198	0,478
HSF1	0,376	0,322	0,242
HSP90AA1	-1,057	-1,194	0,784
HSPA1A	0,154	0,193	0,083
IGF1R	0,205	0,199	0,621
IGFBP2	-5,068	4,264	0,544
IGFBP4	0,149	0,167	0,336
KEAP1	0,278	0,274	0,881
LIPE	0,121	0,100	0,067*

MORF4L2	0,186	0,196	0,703
MTIF3	0,115	0,130	0,287
NANOG	0,162	0,188	0,150
NDUFA1	0,229	0,233	0,902
NFE2L2	0,145	0,163	0,289
NFkB2	0,188	0,204	0,341
NOS2	0,165	0,166	0,978
PAF1	0,277	0,279	0,952
PFKP	0,165	0,161	0,875
PGK1	0,301	0,280	0,461
POU5F1	-1,793	-6,498	0,331
PRDX1	-1,310	-1,883	0,358
PRDX3	0,191	0,189	0,822
REST	0,154	0,136	0,140
RGS2	0,131	0,109	0,113
SCD	0,345	0,281	0,164
SDHA	0,318	0,343	0,747
SLC2A1	0,912	0,649	0,041*
SLC2A3	0,403	0,395	0,894
SLC2A4	0,122	0,153	0,116
SLC2A5	2,316	0,923	0,036*
SOD1	0,297	0,313	0,617
SOD2	0,162	0,191	0,279
SREBF1	0,189	0,153	0,091
STAT3	0,267	0,305	0,282
TFAM	0,185	0,179	0,711
XBP1	0,310	0,289	0,200

	5R20	5R5	P value
ACACA	0,240	0,211	0,135
ACAT1	0,203	0,213	0,419
ACSL1	0,180	0,174	0,499
ACSL3	0,250	0,339	0,086
ACSL6	0,322	0,307	0,639
ADCY6	0,109	0,117	0,743
ADCY9	0,142	0,126	0,038*
AKR1B1	1,096	0,777	0,143
AQP3	0,785	0,507	0,129
ATF4	0,622	0,394	0,001*
ATP5L	-2,029	-5,698	0,139
BAX	0,746	0,570	0,347
BID	0,187	0,172	0,006*
BMP15	0,136	0,085	0,084
CASP3	0,117	0,125	0,127
CASP9	0,243	0,206	0,128
CAT	0,261	0,247	0,477
CDH1	1,263	0,945	0,452
CDX2	0,466	0,346	0,013*

CPT2	0,209	0,192	0,281
DDIT3	0,224	0,225	0,917
Dnmt1	0,197	0,164	0,080
Dnmt3A	1,250	0,832	0,091
Dnmt3B	0,510	0,463	0,717
EGFR	0,206	0,209	0,833
ELOVL6	0,259	0,341	0,243
FADS2	0,227	0,266	0,383
FASN	0,613	0,517	0,226
G6PD	0,562	0,423	0,262
GFPT2	0,147	0,137	0,365
GPAM	0,148	0,138	0,559
GPX1	1,096	0,623	0,020*
GPX4	0,556	0,436	0,184
GSK3A	0,522	0,380	0,097
H3F3A	0,250	0,218	0,251
H3F3B	0,189	0,210	0,427
HDAC2	0,157	0,154	0,893
HIF1A	0,121	0,129	0,287
HMGCS1	0,601	0,427	0,014
HMOX1	0,289	0,431	0,085
HPRT1	0,187	0,176	0,546
HSF1	0,407	0,325	0,138
HSP90AA1	-0,803	-1,397	0,026*
HSPA1A	0,165	0,167	0,939
IGF1R	0,182	0,181	0,926
IGFBP2	-1,109	0,975	0,012
IGFBP4	0,190	0,164	0,201
KEAP1	0,267	0,238	0,166
LIPE	0,127	0,094	0,068*
MORF4L2	0,174	0,174	0,981
MTIF3	0,133	0,114	0,130
NANOG	0,206	0,186	0,369
NDUFA1	0,198	0,215	0,558
NFE2L2	0,137	0,169	0,130
NFkB2	0,187	0,178	0,466
NOS2	0,150	0,156	0,657
PAF1	0,270	0,248	0,281
PFKP	0,136	0,130	0,605
PGK1	0,274	0,268	0,764
POU5F1	-1,340	12,740	0,044*
PPARA	0,100	0,092	0,495
PPARG	0,122	0,107	0,226
PPARGC1A	0,128	0,101	0,110
PRDX1	-1,186	-2,681	0,011*
PRDX3	0,173	0,168	0,683
REST	0,145	0,135	0,187
RGS2	0,113	0,099	0,154
SCD	0,285	0,276	0,821
SDHA	0,279	0,342	0,337

SLC2A1	0,637	0,674	0,826
SLC2A3	0,315	0,400	0,364
SLC2A5	1,993	1,223	0,162
SOD1	0,289	0,257	0,196
SOD2	0,133	0,178	0,165
SREBF1	0,160	0,153	0,542
STAT3	0,284	0,253	0,281
TFAM	0,186	0,169	0,100
XBP1	0,269	0,251	0,371

APÊNDICE D

Dados de expressão gênica da comparação entre os grupos cultivados nas diferentes concentrações de glicose em 20% O₂. As tabelas mostram os valores da média de $1/\Delta Ct$ calculados para cada grupo de estudo e os valores de p para cada comparação. Em destaque os genes que apresentaram significância ou tendência estatística (*p<0,07).

	0R20	5R20	P value
ACACA	0,289	0,240	0,048*
ACAT1	0,239	0,203	0,170
ACSL1	0,173	0,180	0,414
ACSL3	0,293	0,250	0,469
ACSL6	0,381	0,322	0,196
ADCY6	0,102	0,109	0,689
ADCY9	0,136	0,142	0,416
AKR1B1	0,568	1,096	0,005*
AQP3	0,875	0,785	0,726
ATF4	0,313	0,622	0,006*
ATP5L	-4,427	-2,029	0,108
BAX	0,695	0,746	0,529
BID	0,166	0,187	0,090
BMP15	0,125	0,136	0,509
CASP3	0,121	0,117	0,776
CASP9	0,228	0,243	0,449
CAT	0,236	0,261	0,274
CDH1	1,441	1,263	0,650
CDX2	0,400	0,466	0,268
CPT2	0,211	0,209	0,837
DDIT3	0,203	0,224	0,201
Dnmt1	0,187	0,197	0,565
Dnmt3A	1,589	1,250	0,397
Dnmt3B	0,523	0,510	0,923
EGFR	0,218	0,206	0,442
ELOVL6	0,297	0,259	0,580
FADS2	0,226	0,227	0,971
FASN	0,610	0,613	0,982
G6PD	0,460	0,562	0,305
GFPT2	0,177	0,147	0,039*
GPAM	0,144	0,148	0,849
GPX1	1,571	1,096	0,263
GPX4	0,466	0,556	0,444
GSK3A	0,400	0,522	0,186

H3F3A	0,230	0,250	0,566
H3F3B	0,232	0,189	0,244
HDAC2	0,187	0,157	0,393
HIF1A	0,121	0,121	0,975
HMGCS1	0,666	0,601	0,621
HMOX1	0,242	0,289	0,229
HPRT1	0,235	0,187	0,084
HSF1	0,347	0,407	0,098
HSP90AA1	-0,902	-0,803	0,538
HSPA1A	0,167	0,165	0,905
IGF1R	0,199	0,182	0,316
IGFBP2	-1,655	-1,109	0,335
IGFBP4	0,152	0,190	0,098
KEAP1	0,273	0,267	0,774
LIPE	0,093	0,127	0,050*
MORF4L2	0,143	0,174	0,230
MTIF3	0,131	0,133	0,853
NANOG	0,172	0,206	0,096
NDUFA1	0,248	0,198	0,148
NFE2L2	0,149	0,137	0,628
NFkB2	0,163	0,187	0,270
NOS2	0,165	0,150	0,358
PAF1	0,265	0,270	0,818
PFKP	0,163	0,136	0,132
PGK1	0,292	0,274	0,328
POU5F1	-1,675	-1,340	0,527
PPARA	0,104	0,100	0,650
PPARG	0,104	0,122	0,052*
PPARGC1A	0,093	0,128	0,086
PRDX1	-1,276	-1,186	0,777
PRDX3	0,187	0,173	0,180
REST	0,155	0,145	0,298
RGS2	0,124	0,113	0,092
SCD	0,323	0,285	0,403
SDHA	0,370	0,279	0,188
SLC2A1	1,019	0,637	0,134
SLC2A3	0,464	0,315	0,160
SLC2A5	1,624	1,993	0,624
SOD1	0,298	0,289	0,757
SOD2	0,209	0,133	0,032*
SREBF1	0,140	0,160	0,286
STAT3	0,346	0,284	0,072

TFAM	0,192	0,186	0,716
XBP1	0,293	0,269	0,380

	2R20	5R20	P value
ACACA	0,277	0,240	0,193
ACAT1	0,171	0,203	0,223
ACSL1	0,195	0,180	0,121
ACSL3	0,388	0,250	0,025*
ACSL6	0,395	0,322	0,099
ACTB	-0,237	-0,238	0,944
ADCY6	0,118	0,109	0,753
ADCY9	0,151	0,142	0,558
AKR1B1	0,871	1,096	0,257
AQP3	0,756	0,785	0,911
ATF4	0,485	0,622	0,338
ATP5L	-2,258	-2,029	0,833
BAX	0,606	0,746	0,075
BID	0,190	0,187	0,743
BMP15	0,131	0,136	0,861
CASP3	0,136	0,117	0,013*
CASP9	0,307	0,243	0,068
CAT	0,225	0,261	0,160
CDH1	1,205	1,263	0,869
CDX2	0,443	0,466	0,639
CPT2	0,188	0,209	0,378
DDIT3	0,321	0,224	0,003*
Dnmt1	0,169	0,197	0,119
Dnmt3A	1,573	1,250	0,425
Dnmt3B	0,578	0,510	0,688
EGFR	0,241	0,206	0,027*
ELOVL6	0,305	0,259	0,488
FADS2	0,207	0,227	0,269
FASN	0,576	0,613	0,786
G6PD	0,798	0,562	0,183
GFPT2	0,160	0,147	0,426
GPAM	0,177	0,148	0,130
GPX1	1,223	1,096	0,689
GPX4	0,567	0,556	0,939
GSK3A	0,499	0,522	0,820
H3F3A	0,221	0,250	0,340
H3F3B	0,209	0,189	0,515

HDAC2	0,130	0,157	0,339
HIF1A	0,117	0,121	0,578
HMGCS1	0,448	0,601	0,250
HMOX1	0,329	0,289	0,418
HPRT1	0,199	0,187	0,698
HSF1	0,424	0,407	0,660
HSP90AA1	-0,742	-0,803	0,767
HSPA1A	0,174	0,165	0,660
IGF1R	0,191	0,182	0,703
IGFBP2	-3,322	-1,109	0,234
IGFBP4	0,180	0,190	0,652
KEAP1	0,295	0,267	0,247
MORF4L2	0,181	0,174	0,763
MTIF3	0,114	0,133	0,164
NANOG	0,231	0,206	0,304
NDUFA1	0,234	0,198	0,207
NFE2L2	0,171	0,137	0,097
NFkB2	0,202	0,187	0,352
NOS2	0,186	0,150	0,096
PAF1	0,305	0,270	0,198
PFKP	0,205	0,136	0,004*
PGK1	0,288	0,274	0,564
POU5F1	-2,027	-1,340	0,441
PPARG	0,125	0,122	0,890
PPARGC1A	0,120	0,128	0,125
PRDX1	-1,274	-1,186	0,787
PRDX3	0,191	0,173	0,187
REST	0,153	0,145	0,603
RGS2	0,122	0,113	0,148
SCD	0,368	0,285	0,091
SDHA	0,334	0,279	0,402
SLC2A1	0,752	0,637	0,631
SLC2A3	0,386	0,315	0,446
SLC2A5	1,265	1,993	0,121
SOD1	0,328	0,289	0,307
SOD2	0,204	0,133	0,059*
SREBF1	0,160	0,160	0,966
STAT3	0,299	0,284	0,824
TFAM	0,225	0,186	0,072
XBP1	0,289	0,269	0,651

	0L20	5L20	P value
ACACA	0,236	0,309	0,030*
ACAT1	0,259	0,206	0,004*
ACSL1	0,164	0,213	0,019*
ACSL3	0,414	0,320	0,011*
ACSL6	0,366	0,354	0,772
ADCY6	0,141	0,134	0,602
ADCY9	0,147	0,133	0,221
AKR1B1	0,631	0,656	0,935
AQP3	0,808	0,786	0,846
ATF4	0,667	0,454	0,077
ATP5L	-3,458	-4,708	0,587
BAX	1,102	0,650	0,006*
BID	0,181	0,203	0,199
BMP15	0,118	0,155	0,198
CASP9	0,255	0,310	0,161
CAT	0,274	0,283	0,588
CDH1	1,619	1,361	0,254
CDX2	0,429	0,337	0,016*
CPT1B	0,101	0,113	0,518
CPT2	0,222	0,193	0,104
DDIT3	0,207	0,325	0,006*
Dnmt1	0,189	0,187	0,811
Dnmt3A	1,627	0,880	0,079
Dnmt3B	0,640	0,412	0,011
EGFR	0,245	0,193	0,235
ELOVL6	0,326	0,245	0,214
FADS2	0,266	0,205	0,229
FASN	0,608	0,525	0,357
G6PD	0,604	0,650	0,771
GFPT2	0,150	0,176	0,081
GPAM	0,162	0,183	0,050*
GPX1	1,294	1,511	0,582
GPX4	0,455	0,545	0,484
GSK3A	0,373	1,195	0,013*
H3F3A	0,228	0,219	0,816
H3F3B	0,182	0,224	0,041*
HDAC2	0,180	0,182	0,898
HIF1A	0,123	0,136	0,185
HMBS	0,240	0,268	0,381
HMGCS1	0,509	0,428	0,464
HMOX1	0,268	0,344	0,239

HPRT1	0,198	0,223	0,380
HSF1	0,377	0,513	0,167
HSP90AA1	-1,016	-0,750	0,314
HSPA1A	0,149	0,178	0,187
IGF1R	0,196	0,199	0,829
IGFBP2	-3,393	-5,851	0,843
IGFBP4	0,146	0,173	0,376
KEAP1	0,256	0,246	0,637
MORF4L2	0,189	0,207	0,504
MTIF3	0,128	0,131	0,620
NANOG	0,193	0,194	0,965
NDUFA1	0,201	0,185	0,666
NFE2L2	0,151	0,159	0,730
NFKB2	0,174	0,193	0,141
NOS2	0,155	0,215	0,026*
PAF1	0,271	0,299	0,325
PFKF	0,119	0,248	0,004*
PGK1	0,272	0,294	0,472
POU5F1	-1,976	-0,736	0,033*
PPARA	0,093	0,164	0,181
PRDX1	-1,230	-1,156	0,818
PRDX3	0,193	0,200	0,656
REST	0,141	0,156	0,198
RGS2	0,106	0,164	0,002*
SCD	0,274	0,292	0,671
SDHA	0,348	0,281	0,255
SLC2A1	1,050	0,780	0,379
SLC2A3	0,379	0,369	0,895
SLC2A4	0,131	0,148	0,270
SLC2A5	1,865	1,403	0,436
SOD1	0,283	0,310	0,489
SOD2	0,156	0,196	0,202
SREBF1	0,212	0,119	0,160
STAT3	0,309	0,354	0,224
TFAM	0,191	0,233	0,012*
XBP1	0,301	0,281	0,752

	2L20	5L20	P value
ACACA	0,265	0,236	0,186
ACAT1	0,203	0,259	0,011*
ACSL1	0,182	0,164	0,168

ACSL3	0,428	0,414	0,738
ACSL6	0,399	0,366	0,348
ACTB	-0,230	-0,221	0,565
ADCY6	0,115	0,141	0,056
ADCY9	0,159	0,147	0,162
AKR1B1	0,858	0,631	0,094
AQP3	0,665	0,808	0,118
ATF4	0,455	0,667	0,202
ATP5L	-1,368	-3,458	0,073
BAX	1,088	1,102	0,944
BID	0,172	0,181	0,395
BMP15	0,123	0,118	0,847
CASP3	0,132	0,127	0,644
CASP9	0,218	0,255	0,183
CAT	0,243	0,274	0,203
CDH1	1,257	1,619	0,283
CDX2	0,409	0,429	0,538
CPT2	0,207	0,222	0,601
DDIT3	0,365	0,207	0,014*
Dnmt1	0,196	0,189	0,470
Dnmt3A	1,489	1,627	0,787
Dnmt3B	0,473	0,640	0,084
EGFR	0,215	0,245	0,164
ELOVL6	0,382	0,326	0,549
FADS2	0,321	0,266	0,470
FASN	0,733	0,608	0,169
G6PD	0,488	0,604	0,455
GFPT2	0,152	0,150	0,823
GPAM	0,132	0,162	0,165
GPX1	0,951	1,294	0,507
GPX4	0,503	0,455	0,612
GSK3A	0,423	0,373	0,629
H3F3A	0,213	0,228	0,771
H3F3B	0,232	0,182	0,078
HDAC2	0,167	0,180	0,321
HIF1A	0,135	0,123	0,179
HMGCS1	0,892	0,509	0,073
HMOX1	0,237	0,268	0,511
HPRT1	0,223	0,198	0,324
HSF1	0,376	0,377	0,984
HSP90AA1	-1,057	-1,016	0,924
HSPA1A	0,154	0,149	0,799

IGF1R	0,205	0,196	0,425
IGFBP2	-5,068	-3,393	0,909
IGFBP4	0,149	0,146	0,711
KEAP1	0,278	0,256	0,466
LIPE	0,121	0,099	0,292
MORF4L2	0,186	0,189	0,846
MTIF3	0,115	0,128	0,252
NANOG	0,162	0,193	0,031*
NDUFA1	0,229	0,201	0,530
NFE2L2	0,145	0,151	0,702
NFkB2	0,188	0,174	0,338
NOS2	0,165	0,155	0,497
PAF1	0,277	0,271	0,831
PFKF	0,165	0,119	0,046*
PGK1	0,301	0,272	0,182
POU5F1	-1,793	-1,976	0,903
PRDX1	-1,310	-1,230	0,829
PRDX3	0,191	0,193	0,885
REST	0,154	0,141	0,138
RGS2	0,131	0,106	0,095
SCD	0,345	0,274	0,139
SDHA	0,318	0,348	0,695
SLC2A1	0,912	1,050	0,539
SLC2A3	0,403	0,379	0,676
SLC2A4	0,122	0,131	0,519
SLC2A5	2,316	1,865	0,619
SOD1	0,297	0,283	0,692
SOD2	0,162	0,156	0,832
SREBF1	0,189	0,212	0,423
STAT3	0,267	0,309	0,224
TFAM	0,185	0,191	0,442
XBP1	0,310	0,301	0,614

APÊNDICE E

Dados de expressão gênica da comparação dos grupos Rápidos e Lentos cultivados em 5% O₂. As tabelas mostram os valores da média de 1/ Δ Ct calculados para cada grupo de estudo e os valores de p para cada comparação. Em destaque os genes que apresentaram significância ou tendência estatística (*p<0,07).

	0R5	0L5	P value
ACACA	0,252	0,247	0,829
ACAT1	0,239	0,234	0,764
ACSL1	0,192	0,182	0,194
ACSL3	0,405	0,444	0,458
ACSL6	0,361	0,376	0,782
ADCY3	0,122	0,126	0,881
ADCY6	0,109	0,131	0,143
ADCY9	0,139	0,140	0,871
AKR1B1	0,817	1,321	0,354
AQP3	0,831	0,651	0,426
ATF4	0,519	0,559	0,683
ATP5L	4,305	-3,879	0,141
BAX	0,681	0,742	0,780
BID	0,177	0,176	0,814
BMP15	0,127	0,120	0,700
CASP3	0,149	0,138	0,069*
CASP9	0,193	0,221	0,086
CAT	0,268	0,258	0,759
CDH1	1,238	1,978	0,310
CDX2	0,313	0,400	0,138
CPT2	0,205	0,224	0,404
DDIT3	0,207	0,253	0,106
Dnmt1	0,180	0,186	0,358
Dnmt3A	0,912	1,219	0,261
Dnmt3B	0,452	0,496	0,683
EGFR	0,209	0,224	0,322
ELOVL6	0,523	0,431	0,449
FADS2	0,321	0,281	0,550
FASN	0,553	0,725	0,202
G6PD	0,573	0,497	0,569
GFPT2	0,171	0,180	0,744
GPAM	0,157	0,174	0,014*
GPX1	0,728	1,123	0,279
GPX4	0,355	0,440	0,210
GSK3A	0,371	0,517	0,368
H3F3A	0,254	0,240	0,475

H3F3B	0,265	0,245	0,626
HDAC2	0,184	0,179	0,774
HIF1A	0,144	0,135	0,636
HMGCS1	0,715	0,523	0,108
HMOX1	0,300	0,274	0,727
HPRT1	0,248	0,207	0,149
HSF1	0,285	0,375	0,110
HSP90AA1	-3,547	-1,069	0,024*
HSPA1A	0,179	0,189	0,759
IGF1R	0,195	0,198	0,820
IGFBP2	2,476	-2,903	0,327
IGFBP4	0,151	0,174	0,425
KEAP1	0,255	0,256	0,979
LIPE	0,100	0,105	0,427
MORF4L2	0,192	0,191	0,904
MTIF3	0,122	0,136	0,072
NANOG	0,200	0,215	0,555
NDUFA1	0,277	0,221	0,178
NFE2L2	0,186	0,165	0,261
NFkB2	0,200	0,186	0,524
NOS2	0,151	0,157	0,631
PAF1	0,262	0,266	0,880
PFKP	0,135	0,133	0,856
PGK1	0,296	0,294	0,898
POU5F1	4,617	-3,143	0,382
PPARA	0,107	0,097	0,764
PPARG	0,094	0,117	0,026*
PPIA	9,533	-21,281	0,475
PRDX1	-2,899	-1,490	0,128
PRDX3	0,172	0,189	0,315
REST	0,130	0,133	0,718
RGS2	0,121	0,103	0,191
SCD	0,310	0,293	0,692
SDHA	0,328	0,312	0,752
SLC2A1	0,784	0,753	0,897
SLC2A3	0,581	0,454	0,394
SLC2A4	0,138	0,132	0,673
SLC2A5	0,982	1,594	0,180
SOD1	0,315	0,282	0,151
SOD2	0,190	0,196	0,803
SREBF1	0,135	0,155	0,150
STAT3	0,284	0,329	0,440
TFAM	0,183	0,188	0,612

XBP1	0,283	0,293	0,528
-------------	-------	-------	-------

	2R5	2L5	P value
ACACA	0,203	0,245	0,001*
ACAT1	0,211	0,220	0,351
ACSL1	0,174	0,170	0,641
ACSL3	0,360	0,339	0,594
ACSL6	0,274	0,335	0,054
ADCY3	0,122	0,135	0,464
ADCY6	0,115	0,132	0,050*
ADCY9	0,132	0,143	0,081
AKR1B1	0,737	0,853	0,558
AQP3	0,502	0,729	0,097
ATF4	0,585	0,456	0,143
ATP5L	-7,241	46,062	0,554
BAX	0,580	0,593	0,922
BID	0,174	0,168	0,636
BMP15	0,108	0,116	0,532
CASP3	0,141	0,141	0,952
CASP9	0,186	0,206	0,043*
CAT	0,220	0,255	0,063*
CDH1	0,858	1,251	0,005*
CDX2	0,318	0,331	0,805
CPT1B	0,090	0,101	0,465
CPT2	0,193	0,208	0,152
DDIT3	0,202	0,213	0,197
Dnmt1	0,161	0,191	0,001*
Dnmt3A	0,743	0,848	0,590
Dnmt3B	0,474	0,458	0,744
EGFR	0,205	0,198	0,685
ELOVL6	0,376	0,398	0,871
FADS2	0,280	0,277	0,739
FASN	0,573	0,514	0,370
GATM	0,140	0,146	0,438
GFPT2	0,152	0,170	0,148
GPAM	0,151	0,171	0,029*
GPX1	0,625	0,703	0,379
GPX4	0,438	0,460	0,767
GSK3A	0,394	0,354	0,517
H3F3A	0,257	0,239	0,478
H3F3B	0,222	0,227	0,854
HDAC2	0,159	0,177	0,400

HIF1A	0,144	0,144	0,970
HMGCS1	0,625	0,589	0,735
HMOX1	0,316	0,355	0,322
HPRT1	0,205	0,198	0,773
HSF1	0,317	0,322	0,868
HSP90AA1	-1,574	-1,194	0,445
HSPA1A	0,182	0,193	0,627
IGF1R	0,188	0,199	0,314
IGFBP2	1,454	4,264	0,501
IGFBP4	0,154	0,167	0,476
KEAP1	0,238	0,274	0,002*
LIPE	0,098	0,100	0,391
MORF4L2	0,194	0,196	0,928
MTIF3	0,122	0,130	0,184
NANOG	0,184	0,188	0,852
NDUFA1	0,233	0,233	0,984
NFE2L2	0,165	0,163	0,893
NFkB2	0,191	0,204	0,259
NOS2	0,167	0,166	0,945
PAF1	0,239	0,279	0,078
PFKP	0,139	0,161	0,013
PGK1	0,263	0,280	0,512
POU5F1	8,834	-6,498	0,463
PPARA	0,098	0,102	0,662
PPARG	0,105	0,106	0,843
PPARGC1A	0,089	0,096	0,125
PRDX1	-3,416	-1,883	0,211
PRDX3	0,175	0,189	0,249
REST	0,137	0,136	0,881
RGS2	0,098	0,109	0,076
SCD	0,285	0,281	0,888
SDHA	0,277	0,343	0,075
SLC2A1	0,584	0,649	0,381
SLC2A3	0,402	0,395	0,903
SLC2A4	0,134	0,153	0,030*
SLC2A5	1,289	0,923	0,324
SOD1	0,272	0,313	0,284
SOD2	0,172	0,191	0,178
SREBF1	0,166	0,153	0,287
STAT3	0,252	0,305	0,082
TFAM	0,185	0,179	0,715
XBP1	0,272	0,289	0,331

	5R5	5L5	P value
ACACA	0,211	0,262	0,023*
ACAT1	0,213	0,197	0,043*
ACSL1	0,174	0,175	0,921
ACSL3	0,339	0,328	0,802
ACSL6	0,307	0,352	0,108
ADCY6	0,117	0,125	0,715
ADCY9	0,126	0,150	0,009*
AKR1B1	0,777	0,727	0,775
AQP3	0,507	0,671	0,151
ATF4	0,394	0,588	0,066*
ATP5L	-5,698	-10,378	0,754
BAX	0,570	0,589	0,915
BID	0,172	0,195	0,014*
BMP15	0,085	0,121	0,152
CASP3	0,125	0,128	0,729
CASP9	0,206	0,217	0,646
CAT	0,247	0,253	0,776
CDH1	0,945	1,193	0,531
CDX2	0,346	0,371	0,578
CPT1B	0,096	0,107	0,340
CPT2	0,192	0,208	0,332
DDIT3	0,225	0,194	0,032*
Dnmt1	0,164	0,189	0,136
Dnmt3A	0,832	0,878	0,844
Dnmt3B	0,463	0,459	0,969
EGFR	0,209	0,222	0,559
ELOVL6	0,341	0,353	0,862
FADS2	0,266	0,272	0,908
FASN	0,517	0,640	0,059
GATM	0,140	0,129	0,447
GFPT2	0,137	0,149	0,427
GPAM	0,138	0,131	0,652
GPX1	0,623	0,887	0,088
GPX4	0,436	0,512	0,085
GSK3A	0,380	0,475	0,212
H3F3A	0,218	0,257	0,246
H3F3B	0,210	0,202	0,715
HDAC2	0,154	0,152	0,937
HIF1A	0,129	0,113	0,454
HMGCS1	0,427	0,550	0,135
HMOX1	0,431	0,277	0,104
HPRT1	0,176	0,194	0,369

HSF1	0,325	0,348	0,695
HSP90AA1	-1,397	-1,164	0,476
HSPA1A	0,167	0,208	0,182
IGF1R	0,181	0,188	0,474
IGFBP2	0,975	18,671	0,091
IGFBP4	0,164	0,159	0,662
KEAP1	0,238	0,261	0,299
LIPE	0,094	0,110	0,235
MORF4L2	0,174	0,202	0,017*
MTIF3	0,114	0,128	0,340
NANOG	0,186	0,172	0,429
NDUFA1	0,215	0,186	0,605
NFE2L2	0,169	0,152	0,435
NFkB2	0,178	0,190	0,396
NOS2	0,156	0,162	0,584
PAF1	0,248	0,276	0,054*
PFKP	0,130	0,142	0,507
PGK1	0,268	0,305	0,154
POU5F1	12,740	-3,685	0,392
PPARG	0,107	0,097	0,382
PPARGC1A	0,101	0,096	0,653
PRDX1	-2,681	-1,430	0,070
PRDX3	0,168	0,200	0,082
REST	0,135	0,142	0,090
RGS2	0,099	0,122	0,093
SCD	0,276	0,269	0,918
SDHA	0,342	0,325	0,750
SLC2A1	0,674	1,027	0,103
SLC2A3	0,400	0,359	0,704
SLC2A4	0,131	0,125	0,425
SLC2A5	1,223	1,807	0,352
SOD1	0,257	0,277	0,363
SOD2	0,178	0,173	0,851
SREBF1	0,153	0,167	0,381
STAT3	0,253	0,286	0,199
TFAM	0,169	0,178	0,519
XBP1	0,251	0,264	0,279