

Influencia de bajas concentraciones de oxígeno sobre los cultivos de blastocistos

Influence of low oxygen concentrations on blastocyst culture

Luna C¹.; Cortes S¹.; Guijarro A².; Núñez R¹.; Olaya E¹.; Ortega L¹.; Caballero P¹

¹Clínica Tambre. Madrid. España

²Hospital Virgen de la Luz. Cuenca. España.

RESUMEN

En la mayoría de laboratorios de Reproducción Asistida el cultivo de embriones humanos se realiza a concentraciones atmosféricas de oxígeno (20 % de O₂), cuando realmente las concentraciones fisiológicas son menores. Hasta el momento no está claro si estas diferencias suponen o no un beneficio para el desarrollo embrionario. El beneficio o daño puede ocurrir en cualquier momento del ciclo: desde el estadio de ovocito maduro hasta su desarrollo a blastocisto. El objetivo de este trabajo es determinar si el cultivo embrionario a diferentes concentraciones de O₂ supone algún beneficio en las tasas de fecundación y división, así como en la proporción de blastocistos obtenidos de buena calidad, e indirectamente en las tasas de utilización de estos (los que transferimos y los que se congelan), y en las tasas de implantación y gestación. Realizamos 292 ciclos de cultivo embrionario hasta blastocisto, 139 ciclos en incubadores con concentración del 5 % de O₂ y 153 ciclos en incubadores al 20 %. Siendo ambos grupos homogéneos en cuanto al número medio de ovocitos obtenidos, de ovocitos maduros y número total de embriones, no se observaron diferencias significativas en las tasas de fecundación y división. Aunque el número medio total de blastocistos obtenidos fue similar en ambos grupos (4,8 vs 5,1; p=0,349), el porcentaje de blastocistos de buena calidad fue superior en el grupo de los cultivados a bajas proporciones de O₂ (29,6 % vs 36,1 %; p<0,05), siendo estas diferencias significativas. También se encontraron diferencias en la tasa de utilización (33,2 % vs 38,1 %; p<0,05), siendo superior en el grupo cultivado a bajas concentraciones. Dada la tendencia a transferir un solo blastocisto, siempre y

Aceptado: Octubre 2016
Correspondencia: Clara Luna
cluna@clinicatambre.com
SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

cuando disponemos de al menos uno de buena calidad, no se observaron diferencias significativas en la tasa de implantación, de gestación ni de embarazos a término. Con esto podemos concluir que el cultivo a bajas concentraciones de O₂ mejora la cantidad de blastocistos de buena calidad obtenidos, por lo que al disponer de una mayor cantidad de estos podremos proporcionar a nuestros pacientes más posibilidades de éxito en sus ciclos. Habría que ampliar el estudio incluyendo los ciclos de criotransferencias para así poder determinar si efectivamente esto se ve reflejado en las tasas de implantación, gestación y embarazo acumulado.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; 33; 12-19 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Palabras clave: *Cultivo embrionario, embriología, blastocisto, fecundación in vitro*

SUMMARY

In most assisted reproduction laboratories, cultivation of human embryos is performed using atmospheric concentrations of oxygen (20 % O₂), when the true physiological concentrations are lower. So far it is unclear whether these differences in the concentration of O₂ represent a benefit for embryonic development or not. The benefit or harm can occur at any time during the cycle: from the mature oocyte stage until the blastocyst development. The objective of this work is to determine if the embryo culture at different concentrations of O₂ entails any increase in the rates of fertilization and division, as well as the proportion of good quality blastocysts obtained, and indirectly in their use rates (those transferred and those frozen) and also implantation and pregnancy rates. We performed 292 cycles of embryonic culture until blastocyst, 139 cycles in incubators with an O₂ concentration of 5% and 153 cycles in incubators with an O₂ concentration of 20%. Despite both groups being homogeneous in the average number of oocytes, mature oocytes and total number of embryos, no significant differences were observed among the fertilization and division. Although the total average number of blastocysts obtained was similar in both groups (4.8 vs 5.1; p = 0.349), the percentage of good quality blastocysts was higher in the group cultivated at low rates of O₂ (29.6% vs 36.1%; p <0.05), these being significant differences. We also found differences in the use rate (33.2% vs 38.1%; p <0.05), with the group cultivated at low concentrations being higher. Given the trend towards a single blastocyst transfer, and provided we have at least one good quality blastocyst, no significant differences were observed in the implantation, pregnancy or full-term pregnancies. To sum up, we can conclude that embryo cultures with low concentrations of O₂ improves the amount of good quality blastocysts obtained. Thus, having more blastocyst available we are able to provide our patients with more chances of success in their treatment. We should expand the study with the inclusion of cryotransfer cycles, in order to determine if these findings are indeed reflected in the implantation, pregnancy and cumulative pregnancy rates.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; 33; 12-19 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Key words: *Embryo culture, embryology, blastocist, in vitro fertilization*

INTRODUCCIÓN

Mejorar los resultados de los ciclos de FIV e ICSI ha sido siempre de los principales objetivos de los trabajos de investigación en el campo de la Reproducción Asistida. Dado que los embriones permanecen en cultivo *in vitro* durante varios días antes de ser transferidos al útero materno, optimizar las condiciones de cultivo juega un papel clave en estas investigaciones.

Muchos son los factores que influyen en el resultado de los Tratamientos de Reproducción Asistida (TRA), así como

los relacionados con el cultivo de ovocitos y embriones. Algunos de estos factores como el pH (1), temperatura (2), intensidad de la luz (3), etc. han sido estudiados y adaptados para mejorar las condiciones de cultivo y la variabilidad embrionaria.

Fue a partir de la mitad de los años 90, cuando debido a los avances en la tecnología en el cultivo de blastocistos así como al aumento del riesgo de embarazos múltiples, se comenzó a prestar atención al cultivo en bajas concentraciones de O₂ (4).

En condiciones fisiológicas *in vivo* la concentración de O₂

en el útero es de 2-8 % (incluso en el líquido folicular que baña a los folículos preovulatorios la concentración de O₂ es del 1-5,5 %) (5), pero *in vitro* el cultivo se realiza al 5 % de CO₂ y 20 % de O₂ en la mayoría de los laboratorios de RA, protocolo procedente de antiguas técnicas de cultivo de tejidos somáticos (6, 7).

Una concentración de O₂ no fisiológica, elevada, puede crear condiciones desfavorables en el medio, que produzca radicales libres de O₂ que causen estrés oxidativo, el cual puede estar implicado en un desarrollo anómalo de ovocitos y embriones, sobre los cuales, incluso teniendo mecanismos endógenos contra estos, pueden producir fragmentación del DNA, cambios en la expresión génica y alteraciones en los orgánulos y la membrana (8-10). Todo esto puede enlentecer o incluso detener el desarrollo embrionario, producir fragmentación del embrión, apoptosis o abortos (11, 12).

Las especies reactivas de O₂ pueden ser originadas directamente por gametos o embriones, por diferentes mecanismos enzimáticos, y/o por el ambiente en el cual ellos están localizados (13-15).

Por ello algunos laboratorios han implantado los cultivos a concentraciones de O₂ del 5 %, a pesar del alto coste que esto conlleva. Pero el efecto real de esta no está claro hasta el momento: mientras que unos trabajos muestran los beneficios de esta (12, 16-19), otros concluyen que no produce efecto ninguno (20-22).

El objetivo de este trabajo es comprobar si en cultivos a diferentes concentraciones de oxígeno se observan diferencias en las tasas de fecundación y división, así como en la proporción de blastocistos obtenidos y la calidad de estos, y así valorar la influencia sobre las tasas de implantación y gestación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo que incluyó un total de 292 ciclos de cultivo largo con transferencia en fresco de blastocistos, desde Enero de 2009 a Julio de 2014, en la clínica Tambre (Madrid), de los que 241 fueron de donación de ovocitos y 51 con ovocitos propios, correspondientes a 262 pacientes. Los criterios de inclusión para la realización de un ciclo con cultivo largo fueron: que se tratase de un segundo intento (cuando en un ciclo previo no hubiese habido embarazo), o que se tratase de un primer intento tras un embarazo previo, que hubiese un mínimo de 3 embriones de buena calidad en día 3 de cultivo. En este estudio se incluyeron ciclos con al menos 1 blastocisto transferible, independientemente de la calidad de este. Como criterios de exclusión: factor masculino severo y ciclos sin blastocistos.

La supresión hipofisaria se realizó con Cetrotide® en los

ciclos cortos y Decapeptil® en los ciclos largos. Según los niveles séricos de estradiol se inició la estimulación ovárica con FSHr (Gonal; Puregon), añadiendo LH en caso necesario. El criterio para la administración de la HCG (Ovitrelle®) fue la presencia de 2 o más folículos mayores de 18mm de diámetro. Las punciones se realizaron a las 36 horas de la administración de la HCG por vía vaginal guiada por ecografía.

Los ovocitos se incubaron a 37°C en una atmósfera del 20 % de O₂ (Heracell 150, Heraeus) o del 5 % O₂ (Benchtop Incubator, Cook), en medio IVF (Scandinaviam IVF Science AB, Göttenborg) hasta el momento la denudación. La selección de la incubación a diferentes concentraciones de O₂ se realizó de forma aleatoria: historias con número par se incubaron con O₂ atmosférico, e historias con número impar en incubadores al 5 % de O₂.

La eliminación del complejo cúmulo-corona se realizó a las 3-4 h de la captación con hialuronidasa 80 UI/ml (SynVivo®Hyadase, Origio, Denmark). Solo se microinyectaron los ovocitos en estadio de Metafase II. El movimiento de los espermatozoides se enlentece con polivinilpirrolidona (PVP Clinical Grade, Origio, Denmark) y se seleccionaron según su motilidad y morfología.

El proceso de microinyección se realizó en un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200) provisto de óptica Hoffman y placa calefactada (Tokay, Japan) y dos micromanipuladores (Eppendorf, Germany). La microinyección se realizó a las 4-5 horas tras la captación ovocitaria en medio Gamete (Scandinaviam IVF Science AB, Göttenborg), y una vez microinyectados se cultivaron en medio G1 (Scandinaviam IVF Science AB, Göttenborg). La fecundación se evaluó a las 16-20 h. El día 3 de cultivo se pasaron a medio G2 (Scandinaviam IVF Science AB, Göttenborg) hasta el momento de la transferencia. El criterio para realizar cultivo largo a blastocisto se realizó en día 3 de cultivo, cuando había al menos 3 embriones de buena calidad. La selección de embriones a transferir se hizo en día +5, catalogando los blastocistos según el grado de expansión, morfología de la masa celular interna y del blastocele.

Para la transferencia de embriones se escogieron los mejores blastocistos disponibles, según la clasificación de L. Veeck (23), y se vitrificaron los restantes de buena calidad. En el 91,8 % de los ciclos se transfirieron 1 o 2 embriones, en función de la edad de la paciente, el diagnóstico, el número de ciclos previos y el número y calidad de los blastocistos disponibles. La transferencia se realizó ecográficamente, con medio UTM (Origio, Denmark), con catéter Labotect (Germany).

Se realizó la prueba de embarazo 11 días tras de la transfe-

rencia: se consideró embarazo positivo cuando el valor de la β -hCG en sangre periférica fue ≥ 50 mIU/ml, y embarazo clínico cuando se visualizó ecográficamente saco gestacional a las 4-5 semanas.

Estadística

La comparación de medias entre grupos se realizó mediante T de Student. La comparación de tasas se realizó también mediante el cálculo de la media de cada tasa, y la comparación entre grupos mediante el mismo test (T de Student)

Se ha considerado la significación estadística por debajo de 0,05.

RESULTADOS

La inclusión en los grupos de cultivo a baja o alta concentración de O2 se realizó aleatoriamente: se incluyeron 153 ciclos en el grupo de altas concentraciones de O2, y 139 ciclos en el grupo de bajas concentraciones de O2.

Los datos generales que obtuvimos vienen indicados en la Tabla 1: la edad media de las pacientes fue de 41,5 años. La media de ovocitos obtenidos en cada ciclo fue de 10,8, siendo 10,5 de ellos Metafase II, de los que fecundaron el 83 %. Se obtuvieron una media de 4,95 blastocistos, de los que 1,6 fueron de buena calidad. En el 91,8 % de los ciclos se transfirieron 1 o 2 embriones, con una media de 1,8 blastocistos y se congeló una media de 1. La tasa de utilización nos indicó que el 35,5 % de los blastocistos fueron transferidos y/o congelados. La tasa media de gestación fue del 57,8 %.

TABLA 1	
Características clínicas de los ciclos participantes en el estudio. Datos globales de respuesta a la estimulación ovárica controlada.	
	Media
N	292
Edad	41,5
Número total de ovocitos	10,8
Número total de ovocitos maduros	10,5
Número medio de blastocistos	4,95
Tasa de fecundación	83,0%
% blastocistos de buena calidad	1,6
Tasa de utilización	35,5%
Número de congelados	1,0
Número de transferidos	1,8
Tasa de gestación	57,8%

En la Tabla 2 se muestran los datos globales de los ciclos participantes en el estudio.

TABLA 2				
Datos globales según la respuesta a la estimulación ovárica controlada de los grupos participantes en el estudio, en función a las diferentes concentraciones de O2 a las que fueron cultivados				
	20% O2	5% O2	p	
N	153	139		
Edad	41,67	41,32	NS	0,529
Número total de ovocitos	10,75	10,81	NS	0,853
Número total de ovocitos maduros	10,51	10,41	NS	0,769
Número total de embriones	8,62	8,65	NS	0,931
Número medio de blastocistos	4,84	5,13	NS	0,349

Ambos grupos fueron homogéneos en cuanto a la edad media de las pacientes, el número total de ovocitos obtenidos tras la punción y el número medio de ovocitos maduros, con diferencias no significativas (NS). Del mismo modo, no hubo diferencias significativas en el número medio de embriones obtenidos (8,6 vs 8,7 %; NS). Aunque el número medio de blastocistos obtenidos fue ligeramente superior en el grupo cultivado a bajas concentraciones de O2 (4,8 vs 5,1 NS), las diferencias no fueron significativas.

En la Tabla 3 se muestran los resultados clínicos en función a las diferentes concentraciones de O2 a las que fueron cultivados.

No encontramos diferencias significativas en las tasas de fecundación (82,4 % vs 83,9 %; NS), ni de división (58,2 % vs 60,0 %; NS), así como tampoco en el porcentaje de embriones que llegaron a blastocistos de buena calidad (17,5 % vs 21,3 %; $p=0,058$), aunque el valor estuvo muy próximo al valor que consideramos como límite de significación.

El porcentaje de ciclos con al menos un blastocisto de buena calidad para transferir al final del cultivo fue superior en el grupo de incubación al 5 % de O2, aunque sin alcanzar la significación estadística (74,5 % vs 83,5 %; $p=0,062$).

Si que se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de blastocistos de buena calidad obtenidos (29,6 % vs 36,1 %; $p<0,05$) así como en el número medio de blastocistos de buena calidad (1,4 vs. 1,8; $p<0,05$). Esta superioridad se vio reflejada en la tasa de utilización (blastocistos transferidos y vitrificados) que fue superior en el grupo de bajas concentraciones de O2 (33,2 vs 38,1 %; $p<0,05$), por lo que también se pudieron congelar un número superior de blastocistos en este grupo (0,8 vs 1,3; $p<0,005$).

TABLA 3

Resultados clínicos según según la respuesta a la estimulación ovárica controlada de los grupos participantes en el estudio, en función a las diferentes concentraciones de O₂ a las que fueron cultivados.

	20% O ₂	5% O ₂	p	
N	153	139		
Tasa de fecundación	82,36 %	83,86 %	NS	0,349
Tasa de división	58,15 %	60,03 %	NS	0,569
% embriones que llegan a blastocistos de buena calidad	17,48%	21,28%	NS	0,058
% de ciclos con al menos 1 blastocisto de buena calidad	74.5%	83.5%	NS	0.062
% blastocistos de buena calidad	29,63%	36,06%	<0,05	0,041
Número medio de blastocistos de buena calidad	1,39	1,78	<0,05	0,025
Tasa de utilización	33,22%	38,05%	<0,05	0,015
Número de utilizados	2,65	3,20	<0,005	0,002
Número de congelados	0.80	1.33	<0.005	0.004
Número de transferidos	1.85	1.87	NS	0.740
Tasa de implantación	33.55%	37.65%	NS	0.317
Tasa de gestación	54.9%	61.2%	NS	0.280
Tasa de embarazo a término	29.3%	31.7%	NS	0.718

Aunque la diferencia en el porcentaje de embriones que llegaron a blastocisto de buena calidad no alcanzó diferencias significativas ($p=0,058$), este límite de significación estadística sí se alcanzó en el número medio de blastocistos de buena calidad ($p=0,025$).

Dada la limitación en la ley española del número de embriones transferibles, la tendencia a transferir más embriones cuanto peor es calidad de estos, y la de transferir el menor número posible de embriones para evitar, dentro de lo posible, la posibilidad de embarazos múltiples, el número medio de blastocistos transferidos fue similar en ambos grupos (1,85 vs 1,87; NS), lo que se vio reflejado en las tasas de embarazo (54,9 % vs 61,2 %; NS) e implantación (33,5 % vs 37,65 %; NS). Lo mismo ocurre con la tasa de embarazos a término (29,3 % vs 31,7 %; NS).

En la Gráfica 1 se puede observar como partiendo de un número de ovocitos similar en ambos grupos, este va disminuyendo de forma similar hasta el momento en que llega al número de blastocistos utilizados (transferidos y congelados) en que se pueden observar claramente las diferencias significativas. En el punto en el que se realiza la transferencia estas diferencias vuelven a desaparecer al verse limitado el número de blastocistos transferidos.

En la Gráfica 2 se pueden observar las diferencias entre las diferentes tasas:

DISCUSIÓN

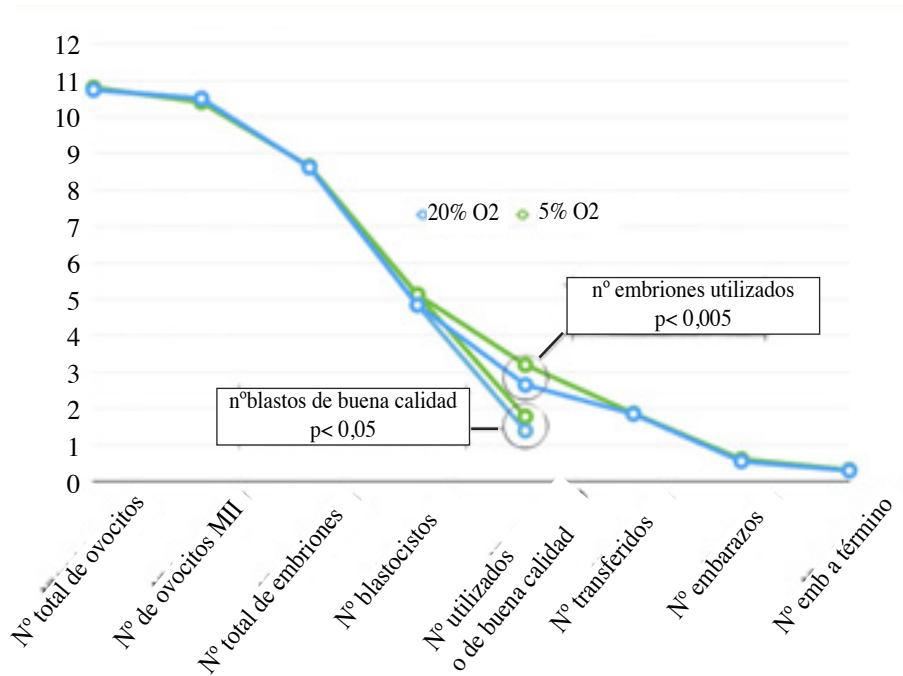
Dado que las condiciones in vivo varían desde las trompas hasta la cavidad uterina, desde la fecundación hasta la implantación, durante las primeras divisiones embrionarias, lo que cabría esperar es que estas también deberían variar durante el cultivo in vitro.

Estudios más recientes realizados acerca de los requerimientos de los embriones en los estadios pre y post-compactación muestran que estos son diferentes: antes de la compactación el metabolismo embrionario se limita a mantener la homeostasis, por lo que son muy sensibles a las condiciones que inducen estrés oxidativo, mientras que tras la compactación su capacidad de regulación aumenta (24). Numerosos estudios en las últimas décadas han mostrado la mejora con bajas concentraciones de O₂ en el cultivo en estadios post-compactación, pero no está claro en los estadios iniciales de desarrollo (21, 25). En un trabajo del grupo de Domoulin (26) tampoco se vieron diferencias en las tasas de embarazo e implantación, en el que los cultivos se realizaron a bajas concentraciones de O₂ solamente desde el día 2 a día 3, en el que se realizaron las transferencias.

En un reciente estudio de N. Guo (27) se ha visto que el cultivo a bajas concentraciones de O₂ ya desde la primeras divisiones embrionarias puede aumentar significativamente

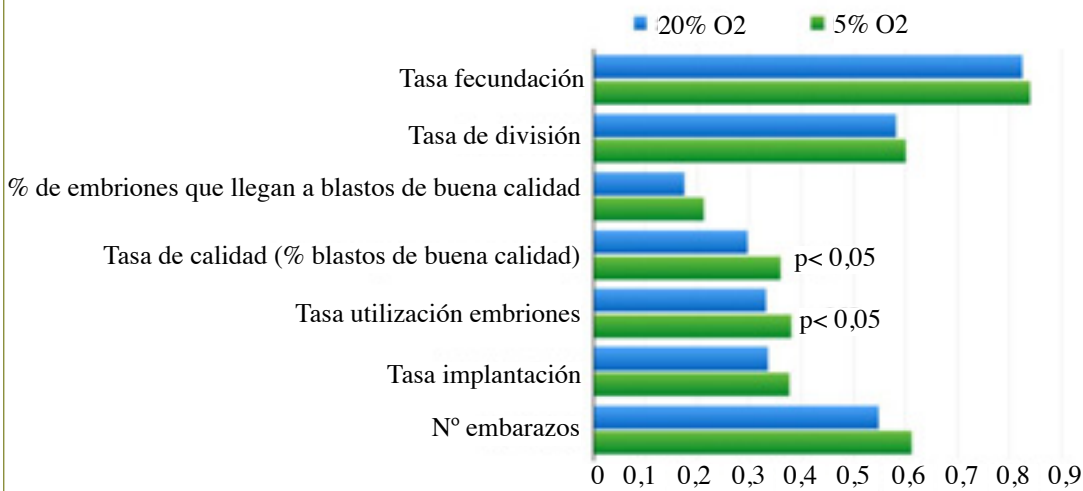
GRÁFICA 1

Variaciones numéricas a lo largo del ciclo en cultivos a diferentes concentraciones de O2.



GRÁFICA 2

Variaciones en las tasas en cultivos a diferentes concentraciones de O2.



el potencial de desarrollo de los embriones, lo que producirá un aumento del número de blastocistos para congelar, optimizando los resultados de los ciclos al aumentar las posibilidades de embarazo en ciclos posteriores. Nuestros resultados así lo confirman.

En un trabajo realizado recientemente por el grupo de Z. Peng, se han comparado los resultados no solo en cultivos a bajas y altas proporciones de O₂, sino también se ha evaluado el efecto de la variación de este a lo largo del cultivo (al 20 % de O₂ hasta día 2, y al 5 % de día 2 hasta día 3 en que se realiza la transferencia embrionaria) (28). En este trabajo se ha visto que parece que no es la concentración en sí la que produce mejores resultados, sino que son las variaciones de esta en los cultivos las que los empeoran. Parece que estas variaciones de O₂ producidas en las primeras divisiones embrionarias no solo tienen efecto inmediato sobre las siguientes divisiones, sino que también lo tienen en el posterior desarrollo in vivo, pero no parecen afectar las tasas de embarazos múltiples ni de abortos.

En la mayoría de los trabajos publicados hasta el momento los gametos procedían de cohortes diferentes, por lo que se establece un sesgo importante a la hora de comparar resultados. En un estudio realizado por el grupo de Kasterstein (29) se comparan las dos diferentes proporciones de O₂ dentro de una misma cohorte de ovocitos, la mitad se cultiva a baja proporción y la otra mitad a niveles atmosféricos, siendo el resto de valores similares en los dos grupos. En los resultados se observa que las tasas de fertilización y división embrionaria son similares, pero en el grupo de cultivo en bajas proporciones de O₂, cuando se realizan las transferencias en día 3 de cultivo, se obtienen resultados superiores en cuanto a tasas de implantación, embarazo y nacido vivo.

Los resultados de un meta-análisis realizado por Gomes-Sobrinho en el que se incluyeron 7 trabajos, solo determinó diferencias significativas en las tasas de implantación cuando se incubó al 5 % de O₂ y se transfirieron embriones en día 5 o 6, pero no en las tasas de fecundación, implantación ni embarazo evolutivo cuando se realizaron los cultivos a diferentes concentraciones de O₂, y se transfirieron en día 2 o 3 o en blastocistos (30).

Otro meta-análisis reciente de la Cochrane que incluye 4 trabajos, aunque reseña la baja metodología de estos, muestra un beneficio en la tasa de recién nacidos vivos del 30 % hasta el 32-43 % si el cultivo ha sido a bajas concentraciones de O₂, y también una mejora en las tasas de embarazo clínico y evolutivo, así como no se observaron evidencias de aumento en los embarazos múltiples, abortos y anomalías congénitas, por lo que concluyen que el cultivo a bajas concentraciones de O₂ aumentaría las tasas de éxito

en estos ciclos, lo que produciría un aumento de recién nacidos sanos (31).

En nuestro trabajo se pudo observar que transfiriendo al menos un blastocisto de buena calidad la tasa de embarazo aumentaba de forma significativa (64,3 % vs 33,9 %; $p < 0,001$) frente a los ciclos en que no hubieron blastocistos de buena calidad transferibles. Este efecto se vio contrarrestado por la tendencia a transferir un mayor número de embriones cuanto peor es la calidad de estos.

Por otro lado el hecho de que el porcentaje de embriones que llegaron a blastocistos de buena calidad tuviese una menor significación ($p = 0,058$) que el porcentaje de blastocistos de buena calidad ($p = 0,041$) fue muy relevante, porque nos indicó que la influencia de un tipo u otro de incubador no afectaba tanto a que llegasen más embriones a blastocistos, como a que la calidad de los que llegan a blastocistos sea mayor.

Nuestros resultados muestran que cultivando a bajas concentraciones de O₂ se obtiene una mayor proporción de blastocistos de buena calidad, por lo que podemos obtener una mayor tasa de utilización (blastocistos transferidos y congelados), lo que conlleva la posibilidad de congelar un mayor número de estos para posteriores embarazos. Aunque esto no se ve reflejado en las tasas de implantación, gestación y embarazo a término, observamos una ligera tendencia a que estas sean superiores en los cultivos a bajas concentraciones de O₂. Sería necesario ampliar el estudio añadiendo los ciclos de estas criotransferencias para poder ver si esto se ve reflejado en una mejora en la tasa de embarazo acumulativa.

BIBLIOGRAFIA

1. Swain JE. Is there an optimal pH for culture media used in clinical IVF? *Hum Reprod Update* 2012; 18:333-9.
2. Garrisi GJ, Chin AJ, Dolan PM, Nagler HM, Vasquez-Levin M, Navot D, et al. Analysis of factors contributing to success in a program of micromanipulation-assisted fertilization. *Fertil Steril* 1993; 59:366-74.
3. Ottosen LD, Hindkjaer J, Ingerslev J. Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24:99-103.
4. Higdon HL, Blackhurst DW and Boone WR. Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertil Steril* 2008; 89: 703-710.
5. Gosden RG, Byatt-Smith JG. Oxygen concentration gradient across the ovarian follicular epithelium: model, predictions and implications. *Hum Reprod* 1986; 1: 65-8.
6. Byatt-Smith JG, Leese HJ, Gosden RG. An investigation by mathematical modelling of whether mouse and human preimplantation embryos in static culture can satisfy their demands for oxygen by diffusion. *Hum Reprod* 1991; 6: 52-57.
7. Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits *J. Reprod Fertil* 1993; 99: 673-679.

8. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum. Reprod* 2000; 15 Suppl 2: 199-206.
9. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril*. 2004; 82: 593–600.
10. Guérin P, El Mouatassim S, Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 2001; 7: 175–89.
11. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragment embryos. *Hum Reprod* 1998, 13: 998-1002.
12. Kovacic B, Vlaisavljevic V. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008, 17: 229-23.
13. Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med*. 1993; 15:69–75.
14. Harvey AJ, Navarrete SA, Kirstein M, Kind KL, Fischer B, Thompson JG. Differential expression of oxygen-regulated genes in bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 290-299.
15. Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U, Bahçeci M. Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 409-417.
16. de los Santos MJ, Gamiz P, Albert C, Galán A, Vitoria T, Pérez S, Romero JL, Remohi J. Reduced oxygen tension improves embryo quality but not clinical pregnancy rates: a randomized clinical study into ovum donation cycles. *Fertil Steril* 2013; 100: 402-407.
17. Dumoulin JC, Meijers CJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JP, Evers JL. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. *Hum Reprod*. 1999; 14: 465–9.
18. Waldenström U, Engström AB, Hellberg D, Nilsson S. Low oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertil Steril*. 2009; 91:2461–5.
19. Ciray HN, Aksoy T, Yaramanci K, Karayaka I, Bahçeci M. In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes. *Fertil Steril*. 2009; 91 Suppl 4: 1459–61.
20. Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, Barnett BD, Madden JD. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum Reprod* 2009; 24: 300-307.
21. Kovacic B, Sajko MC, Vlaisavljevic V. A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2010; 94: 511-519.
22. Calzi F, Papaleo E, Rabellotti E, Ottolina J, Vailati S, Viganò P, Candiani M. Exposure of embryos to oxygen at low concentration in a cleavage stage transfer program: reproductive outcomes in a time-series analysis. *Clin Lab* 2012; 58: 997-1003.
23. Veeck L. and Nikica Zaninovic, eds. *An Atlas of Human Blastocysts*. New York: Parthenon Publishing Group, 2003: 1–257.
24. Lane M and Gardner DK. Embryo culture medium: which is the best? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21: 83-100
25. Booth PJ, Holm P and Callesen H. The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. *Theorogenology* 2005; 63: 2040-2052
26. Dumoulin JC, Vanvuchelen RC, Land JA, Pieters MH, Geraedts JP, Evers JL. Effect of oxygen concentration on in vivo fertilization and embryo culture in the human and the mouse. *Fertil Steril*. 1995; 63: 115–9.
27. Na Guo, Yufeng Li, Jihui Ai, Longjie Gu, Wen Chen, Qun Liu. Two different concentrations of oxygen for culturing precompaction stage embryos on human embryo development competence: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(9): 6191-6198
28. Zhao-FengPeng, Sen-Lin Shi, Hai-Xia Jin, Gui-Dong Yao, En-Yin Wang, Hong-Yi Yang, Wen-Yan Song, Ying-Pu Sun. Impact of oxygen concentrations on fertilization, cleavage, implantation, and pregnancy rates of in vitro generated human embryos. *Int J ClinExp Med* 2015; 8(4): 6179-6185
29. Kasterstein E, Strassburger D, Komarovskiy D, Bern O, Komsky A, Raziell A, Friedler S, Ron-El R. The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo development in a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet*. 2013 Aug; 30(8): 1073-9.
30. Gomes Sobrinho DB, Oliveira JB, Petersen CG, Mauri AL, Silva LF, Massaro FC, Baruffi RL, Cavagna M, Franco JG Jr. IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011 Nov 1; 9:143.
31. Bontekoe S, Mantikou E, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012. Issue 7.