



David Barreira Gomes Sobrinho

Resultados de FIV/ICSI após o desenvolvimento do embrião humano em baixa concentração de oxigênio: uma meta-análise

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Alcântara Oliveira

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

UNESP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO**

Gomes-Sobrinho, David Barreira.

Resultados de FIV/ICSI após o desenvolvimento do embrião humano em baixa concentração de oxigênio: uma meta-análise / David Barreira Gomes Sobrinho. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: João Batista Alcântara Oliveira

Capes: 40101150

1. Reprodução humana. 2. Fertilização *in vitro*.

Palavras-chave: Baixa Concentração de Oxigênio; Cultura de Embriões; Gás Atmosférico; FIV/ICSI.

Dedicatórias

A **Deus** por Seu amor imutável e por Sua graça abundante.

À minha mãe, **Mirene**, pela criação, pelo incentivo e pelo ensino dos princípios éticos.

À minha tia **Conceição** por ter cuidado de mim como a um filho e ensinado o respeito a Deus e às pessoas.

Ao meu pai, **Luiz** (in memoriam), pelo exemplo de homem a ser seguido.

Ao meu irmão, **Diogo**, pela amizade de todas as horas.

À minha esposa, **Uyhara**, pelo apoio, compreensão, e por aceitar que o tempo disponível para estarmos juntos fosse dividido com a pesquisa.

À minha filha, **Ana Clara**, pela alegria nos olhos e por já ter se tornado jóia preciosa em minha vida.

Aos meus avôs, **Wilson e Antônia, tios e primos**, pelos momentos gostosos, alegres, saudáveis e inesquecíveis...

A **Universidade de Brasília, colegas e pacientes do Hospital Universitário de Brasília** por terem me acolhido e me dado a oportunidade de me tornar médico.

Aos **meus preceptores, colegas, funcionários e pacientes do Hospital Regional do Gama** por terem me ajudado a ser especialista em Ginecologia e Obstetrícia.

Ao **GENESIS – Centro de Assistência em Reprodução Humana** por ter me ajudado nos primeiros passos da Reprodução Assistida e depois me dar oportunidade de exercê-la dignamente.

Homenagens

Ao **Prof. Dr. José Gonçalves Franco Jr**, ícone da reprodução humana brasileira, por me dar a oportunidade de ter meu tão sonhado título de Mestre, pois sem sua ajuda não teria sido possível. Jamais esquecerei sua atitude e disponibilidade demonstradas no pior momento da minha carreira acadêmica.

Ao **Prof. Dr. João Batista Alcântara Oliveira**, pela paciência, disponibilidade, educação e gentileza demonstradas. Obrigado ainda por sua orientação e ensinamentos preciosos. Realmente, tive orientador.

Agradecimentos

Ao **Prof. Franco Jr**, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao meu orientador, **Prof. João Batista**, também pela oportunidade de realizar este trabalho, e principalmente, pela grande disponibilidade e apoio.

Ao **corpo clínico e funcionários do Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Jr** pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo apoio e pela grande disponibilidade.

Ao meu amigo **Bruno Ramalho de Carvalho** pela ajuda na redação deste trabalho.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, por serem tão prestativos e me atenderem com tanta gentileza, especialmente à **Ana Cláudia, César** e a **Janete**.

Às **Prof^a. Dra. Claudia Petersen** e **Prof^a. Dra. Anice Martins** pelas sábias considerações na minha qualificação.

*À **Prof^a. Adjunta Anaglória Pontes** por ter me inserido
no Programa de Pós-Graduação da FMB-UNESP.*

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe está a ignorância”.

Hipócrates

Sumário

APRESENTAÇÃO.....	11
-------------------	----

CAPÍTULO I

Revisando os efeitos da concentração de oxigênio sobre o desenvolvimento embrionário.....	12
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	16
ESTRESSE OXIDATIVO.....	17
ESTUDO EM ANIMAIS.....	19
ESTUDO COM EMBRIÕES HUMANOS.....	21
DISCUSSÃO.....	26
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

CAPÍTULO II

IVF/ICSI outcomes after human embryo development on low oxygen tension: a meta-analysis.....	35
ABSTRACT.....	37
BACKGROUND.....	39
METHODS.....	41
RESULTS.....	48
DISCUSSION.....	50
REFERENCES.....	56

FIGURAS

Figure 1. QUOROM statement flow diagram illustrating selection of trials included in the meta-analysis. RCT: randomised controlled trial.....	65
Figure 2. Fixed-effect model. Forest plot for fertilisation rate.....	66
Figure 3. Fixed-effect model. Forest plot for implantation rate. A: All cycles; B: Only cycles in which embryos were transferred on day 2 or 3; C: Only cycles in which embryos were transferred at the blastocyst stage.....	67

Figure 4. Fixed-effect model. Ongoing pregnancy rates. A: All cycles; B: Only cycles in which embryos were transferred on day 2 or 3; C: Only cycles in which embryos were transferred at the blastocyst stage.....	68
--	----

TABELA

Table I. Main characteristics of the randomised controlled trials (RCT) on human embryo development at low oxygen tension.....	69
---	----

ANEXO

PARECER DE APROVAÇÃO DO CEP	70
--	----

Apresentação

O primeiro artigo desta dissertação é um artigo de revisão de literatura sobre a influência da concentração de oxigênio no cultivo embrionário em fertilização *in vitro* (FIV), que vem gerando discussão nas últimas décadas. Comentamos a respeito das concentrações de oxigênio no trato genital reprodutivo feminino de mamíferos, dos efeitos do estresse oxidativo sobre os embriões, e dos resultados em FIV em estudos animais e humanos.

No segundo artigo, que dá nome a dissertação, fizemos uma meta-análise dos resultados de FIV/ICSI após o desenvolvimento do embrião humano em baixa concentração de oxigênio, usando trabalhos prospectivos e randomizados publicados até o momento. Esse trabalho avaliou as taxas de fertilização, implantação, gravidez clínica e em curso dos embriões que foram cultivados comparativamente em concentração atmosférica e de cerca de 5% de oxigênio.

Capítulo I

Revisando os efeitos da concentração de oxigênio sobre o desenvolvimento embrionário

Padronizado de acordo com as normas para publicação
na revista JBRA Assisted Reproduction

Revisando os efeitos da concentração de oxigênio sobre o desenvolvimento embrionário

Reviewing the effects of oxygen tension on embryonic development

David Barreira Gomes Sobrinho, MD^{1,4,5}

João Batista Alcântara Oliveira, MD, MSc, PhD^{1,2,3}

Bruno Ramalho de Carvalho, MD, MSc⁴

José Gonçalves Franco Júnior, MD, MSc, PhD^{1,2,3}

¹Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, Brasil.

²Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Jr., Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

³Centro Paulista de Diagnóstico, Pesquisa e Treinamento, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

⁴Genesis – Centro de Assistência em Reprodução Humana, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

⁵Endereço para Correspondência: David Barreira Gomes Sobrinho, MD. Genesis - Centro de Assistência em Reprodução Humana. SHLS 716, Bloco "L", Salas "L" 328/331, Centro Clínico Sul - Ala Leste. Brasília, Distrito Federal, CEP: 70.390-907. Telefax: + 55 61 3345-8030. E-mail: david@genesis.med.br.

Os autores do presente estudo declaram que não têm nenhum conflito de interesse sobre o conteúdo discutido no texto, incluindo relações de trabalho, assessoria, honorários e direitos dos autores.

RESUMO

Apesar do conhecimento de que os processos de desenvolvimento e implantação embrionários de mamíferos não ocorrem em concentração atmosférica *in vivo*, é prática comum em laboratórios de fertilização *in vitro* (FIV) a cultura de embriões em concentração próxima a 20% de oxigênio. A discrepância entre as concentrações de oxigênio leva a importantes discussões sobre seus efeitos no desenvolvimento embrionário *in vitro*. Acredita-se que o cultivo de embriões em ambientes com concentração atmosférica de oxigênio pode ser prejudicial à qualidade dos mesmos por predispor-los à interferência negativa de radicais livres de oxigênio (RLO), resultantes do estresse oxidativo, levando a ação deletéria sobre o metabolismo embrionário e a expressão gênica de blastocitos cultivados naquelas condições. Frente aos argumentos favoráveis e contrários a cultura de embriões *in vitro* em concentrações de oxigênio semelhantes às encontradas *in vivo*, este artigo de revisão pretende condensar e debater os dados da literatura acerca da influência da concentração de oxigênio sobre a qualidade de embriões cultivados *in vitro*.

Palavras-chave: baixa concentração de oxigênio, cultura embrionária, FIV/ICSI, gas atmosférico, radicais livres de oxigênio.

ABSTRACT

Despite the fact that the processes of embryonic development and deployment of mammals do not occur in atmospheric concentration *in vivo*, it is common practice in laboratories for *in vitro* fertilization (IVF) the culture of embryos in a concentration close to 20% of oxygen. The discrepancy between the concentrations of oxygen leads to important discussions about their effects on *in vitro* embryonic development. It is believed that the cultivation of embryos in atmospheric concentration of oxygen can be detrimental to the quality of the data for predisposing them to the negative interference of reactive oxygen species (ROS), resulting in oxidative stress, leading to deleterious effects on metabolism embryonic gene expression and blastocysts grown in those conditions. Faced with arguments for and against the culture of embryos in *in vitro* oxygen concentrations similar to those found *in vivo*, this review article aims to condense and discuss the literature concerning the influence of oxygen concentration on the quality of embryos cultured *in vitro*.

Keywords: low tension oxigen, embryo culture, gas atmosphere, IVF/ICSI, reactive oxygen species.

INTRODUÇÃO

A cultura de embriões em concentração atmosférica de oxigênio, próxima de 20%, é prática comum em laboratórios de fertilização *in vitro* (FIV) (Bahçeci *et al*, 2005), embora a concentração de oxigênio na cavidade uterina e ovidutos de mamíferos seja inferior a 9% nos diferentes momentos do ciclo reprodutivo, principalmente na fase de desenvolvimento embrionário tardio e implantação (Fischer & Bavister, 1993).

Essa significativa diferença entre as concentrações de oxigênio leva a importantes discussões sobre seus efeitos no desenvolvimento embrionário *in vitro*. Apesar de não se conhecer ao certo o significado da reduzida concentração intrauterina de oxigênio, acredita-se que seja parte de um mecanismo de bloqueio da sua toxicidade sobre o blastocisto na fase de peri-implantação (Fischer & Bavister, 1993; Bavister, 2004). O cultivo de embriões em ambientes com concentração atmosférica de oxigênio pode ser prejudicial à qualidade dos mesmos por predispor-los à interferência negativa de radicais livres de oxigênio (RLO), resultantes do estresse oxidativo, o que não ocorreria *in vivo* (Fischer & Bavister, 1993; Guérin *et al*, 2001; García *et al*, 2010). Há dados na literatura sugerindo ação deletéria sobre o metabolismo embrionário (Karagenc *et al.*, 2004) e a expressão gênica de blastocitos cultivados naquelas condições (Harvey *et al*, 2004).

Frente aos argumentos favoráveis e contrários a cultura de embriões *in vitro* em concentrações de oxigênio semelhantes às encontradas *in vivo*, este artigo de revisão pretende condensar e debater os dados da literatura acerca da influência da concentração de oxigênio sobre a qualidade de embriões cultivados *in vitro*.

ESTRESSE OXIDATIVO

Os efeitos nocivos sobre embriões cultivados em concentrações atmosféricas de oxigênio têm sido atribuídos à geração de RLO, que são capazes de se difundir, passar pelas membranas celulares e alterar a conformação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Guérin *et al*, 2001). A formação de RLO pode ser proveniente do metabolismo do embrião e dos fluídos foliculares e tubários (Guérin *et al*, 2001). O metabolismo embrionário gera RLO por meio de vários mecanismos metabólicos e enzimáticos, envolvendo principalmente a fosforilação oxidativa e a ação das enzimas nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH) oxidase e xantina-oxidase, sendo a contribuição relativa de cada variável de acordo com a espécie animal, o estágio de desenvolvimento embrionário e as condições de cultivo (Guérin *et al*, 2001). Ainda, diversos fatores externos podem aumentar a produção de RLO para o embrião, como concentração de oxigênio circundante, cátions metálicos (ferro e cobre), aminoxidase, e até mesmo espermatozóides durante a fertilização *in vitro*, principalmente os que permanecem fora do oócito (Guérin *et al*, 2001).

Os RLO induzem peroxidações lipídicas com repercussão na divisão celular, no transporte de metabólitos e disfunção mitocondrial, sendo relacionados ao bloqueio da clivagem embrionária inicial. No metabolismo das proteínas, podem induzir a formação de disulfito por oxidação do radical sulfidrila, levando a inativação de enzimas como a gliceraldeído-3-fosfato-deidrogenase, com prejuízos à respiração celular. Ainda, os RLO podem induzir a fragmentação do DNA nuclear, com potencial supressão do desenvolvimento embrionário *in vitro* (Guérin *et al*, 2001).

Além de danos diretos e indiretos ao DNA (Iwata *et al*, 2000), estão entre as consequências danos a organelas e membranas (Kwon *et al*, 1999), bloqueio do desenvolvimento

embrionário (Guérin *et al*, 2001), depleção de adenosina-trifosfato (Guérin *et al*, 2001), estímulo à apoptose celular (Guérin *et al*, 2001) e alterações da expressão gênica (Harvey *et al*, 2004). O DNA mitocondrial é especialmente susceptível a mutações por causa da falta de histonas que, normalmente, bloqueiam a ação dos RLO. São os defeitos no DNA mitocondrial que irão induzir disfunções metabólicas celulares e, conseqüentemente, retardo ou parada do desenvolvimento embrionário, ou apoptose. O acúmulo de radicais superóxidos e a diminuição dos níveis de superóxido-dismutase estão envolvidos no processo de apoptose, que está relacionada a fragmentação do blastocisto (Guérin *et al*, 2001).

Diversos mecanismos de defesa estão presentes no embrião e nos fluidos que o rodeiam, e têm funções complementares (Guérin *et al*, 2001). *In vivo*, a proteção externa, presente nos fluídos foliculares e tubários, é constituída, principalmente por antioxidantes não-enzimáticos, como hipotaurina, taurina e ácido ascórbico; e a interna, constituída, principalmente, por antioxidantes enzimáticos, como superóxido-dismutase, glutathione-peroxidase e γ -glutamylcisteína-sintetase. O dano oxidativo pode resultar da produção excessiva e/ou da diminuição do *clearance* de radicais livres pelos mecanismos de defesa. Assim, as três estratégias para evitar o estresse oxidativo são prevenção para evitar a formação de radicais livres, neutralização com antioxidantes e reparo através do DNA mitocondrial (Guérin *et al*, 2001).

ESTUDOS EM ANIMAIS

As evidências do efeito prejudicial da concentração atmosférica de oxigênio no desenvolvimento embrionário *in vitro* são baseadas, principalmente, em modelos animais, usando, na grande maioria bovinos e roedores (Harlow & Quinnn, 1979; Pabon *et al*, 1989; McKiernan & Bavister, 1990; Batt *et al*, 1991; Umaoka *et al*, 1992; Kwon *et al*, 1999; Yuan *et al*, 2003; Karja *et al*, 2004; Leoni *et al*, 2007). Por nunca terem sido expostos a concentrações atmosféricas de oxigênio, os embriões e gametas de várias espécies de mamíferos cultivados nessas condições podem ser submetidos a estresse oxidativo mediado por radicais livres de oxigênio (RLO), que podem comprometer sua capacidade de desenvolvimento (Mastroiani & Jones, 1965; Bayatt-Smith *et al*, 1991; Fischer & Bavister, 1993; Bahçeci *et al*, 2005).

As concentrações de oxigênio na cavidade uterina e nos ovidutos de diversas espécies têm sido estudadas há mais de quatro décadas (Mastroianni & Jones, 1965; Garriss & Mitchell, 1979; Hammer *et al*, 1981; Fischer & Bavister, 1993) e a maior parte dos estudos demonstra prejuízos do oxigênio em concentração atmosférica sobre embriões cultivados *in vitro* (Bavister, 1995). Tal afirmativa confirma-se pela demonstração de redução da massa celular interna (MCI) e evolução fetal de blastocistos provenientes de embriões de roedores cultivados em oxigênio a 20% quando comparados aos cultivados a 5%, embora não se tenha observado diferenças na evolução a blastocistos ou na morfologia destes (Karagenc *et al*, 2004).

O estudo de Fischer & Bavister, 1993, foi o primeiro a posicionar microeletrodos polarográficos no lúmen de útero e tubas de primatas, roedores e coelhos para mensuração das concentrações de oxigênio em diferentes fases reprodutivas, demonstrando concentrações

máximas de oxigênio de 40% em relação à concentração atmosférica. Neste estudo, a tensão de oxigênio em macacas *Rhesus* foi de aproximadamente 8% nas tubas e de aproximadamente 2% na cavidade uterina; em roedoras e coelhas, tais concentrações foram, respectivamente, de 5% e 3,5% no momento da implantação embrionária, reforçando a hipótese de que embriões jamais estariam submetidos a concentrações tão elevadas de oxigênio quanto a atmosférica (Fischer & Bavister, 1993).

Em estudos com fertilização *in vitro* (FIV), observa-se maior viabilidade embrionária, além de melhor e maior número de embriões que atingem estágio de blastocisto, entre os cultivados em concentração reduzida de oxigênio quando comparados a embriões cultivados a concentração atmosférica (Harlow & Quinn, 1979; Pabon *et al*, 1989; McKiernan & Bavister, 1990; Batt *et al*, 1991; Umaoka *et al*, 1992; Kwon *et al*, 1999; Yuan *et al*, 2003; Karja *et al*, 2004; Leoni *et al*, 2007). Entretanto, os dados sugerem que a morfologia embrionária, a quantidade de embriões que chegam a blastocistos após FIV ou mesmo os resultados iniciais de implantação, como taxa de gravidez clínica ou bioquímica e/ou implantação, após cultivo em concentrações diferentes de oxigênio, não são preditores precisos dos resultados clínicos finais (Meintjes *et al*, 2009).

Karagenc *et al* (2004) observaram redução do desenvolvimento da massa celular interna e uma queda drástica na proporção de blastocistos transferidos que se desenvolveram em fetos quando embriões foram cultivados em oxigênio atmosférico, apesar da aparência morfológicamente normal destes blastocistos. Essa observação ilustra mais uma vez a falta de confiabilidade da aparência morfológica para avaliar a viabilidade do embrião (Bavister, 2004). Assim, reforça-se a tese de que a verdadeira competência embrionária deve ser confirmada pela ocorrência de nascidos vivos (Karagenc *et al*, 2004; Waldenström *et al*, 2010).

ESTUDOS COM EMBRIÕES HUMANOS

Em vista de implicações éticas, a realização de estudos bem desenhados com embriões humanos torna-se difícil, não se podendo, desta forma, produzir dados com maior relevância clínica. Apesar de as baixas concentrações de oxigênio concorrerem para a viabilidade embrionária e melhor desenvolvimento ao estágio de blastocisto em estudos com FIV em animais, a interferência negativa das concentrações elevadas de oxigênio sobre embriões humanos é controversa. Enquanto alguns estudos demonstraram taxas de implantação e gravidez significativamente maiores em ambientes com oxigênio a baixas concentrações (Catt & Henman, 2000), outros não demonstraram melhorias significativas dos resultados terapêuticos (Dumoulin *et al*, 1995; Dumoulin *et al*, 1999).

O estudo de Dumoulin *et al*, 1999, apresentou evolução mais expressiva de embriões humanos a blastocistos, com maior celularidade, em cultivo em oxigênio a 5%, mas sem diferenças significativas entre as taxas de implantação e gravidez obtidas para os cultivados a 20% (Dumoulin *et al*, 1999). Entretanto, as transferências embrionárias aconteceram no segundo e terceiro dia após a FIV, o que limita conclusões, já que o ambiente intrauterino pode favorecer a implantação, por minimizar ou eliminar efeitos deletérios do estresse oxidativo. O estudo de Catt & Henman, 2000, por outro lado, demonstrou taxas de gravidez superiores para embriões cultivados a menores concentrações de oxigênio (Catt & Henman, 2000).

A discrepância entre os dados de estudos em animais e humanos pode ser parcialmente explicada pela diferença na fisiologia embrionária das espécies, considerando as características específicas de espécies altamente puras dos animais usados em laboratório e da

variedade de condições de cultura e transferência embrionária no laboratório (Bavister, 2004).

Ainda, os estudos com embriões humanos que não identificaram benefício de resultados clínicos com baixa concentração de oxigênio foram realizados com transferência em D2 ou D3, não permitindo o benefício da baixa concentração de oxigênio no desenvolvimento do blastocisto e da massa celular interna *in vitro* após a ativação do genoma embrionário (Dumoulin *et al*, 1999; Catt & Henman, 2000; Bahçeci *et al*, 2005). Isso está em contraste com estudos realizados em animais, pois a rotina é a transferência em blastocisto (Umaoka *et al*, 1991,1992; Karangenc *et al*, 2004).

Fisiologicamente, o útero fornece um ambiente nutricional diferente das tubas uterinas e, portanto, a transferência de embriões em estágio de clivagem causaria estresse homeostático e uma redução do potencial de implantação embrionário (García *et al*, 2010). Consequentemente, a transferência em estágio de blastocisto permitiria uma melhor sincronização com o ritmo das contrações uterinas e o embrião, bem como escolher de maneira mais “natural” embriões com maior potencial de desenvolvimento e implantação (García *et al*, 2010).

Quando as transferências de blastocistos foram avaliadas em um pequeno estudo com 22 pacientes, a taxa de gravidez clínica parece ter melhorado em baixa concentração de oxigênio, embora o número pequeno demais de pacientes não tenha permitido alcançar significância estatística (Kea *et al*, 2007). Seguiram-se estudos maiores que verificaram significativamente melhores resultados em baixas concentrações de oxigênio em transferência de blastocisto (Kovacic & Vlaisavljevic, 2008; Waldenström *et al*, 2008; Ciray *et al*, 2009; Meintjes *et al*, 2009; Kovacic *et al*, 2010). Algumas peculiaridades são relevantes

nestes estudos, como maior quantidade de embriões que chegaram a blastocisto em ótima qualidade (Kovacic & Vlaisavljevic, 2008; Waldenström *et al*, 2008; Ciray *et al*, 2009; Meintjes *et al*, 2009), com massa celular interna normal (Kovacic & Vlaisavljevic, 2008), aumento das taxas de implantação (Meintjes *et al*, 2009), gravidez clínica e nascidos vivos (Waldenström *et al*, 2008; Meintjes *et al*, 2009).

Em um modelo de estudo com oócitos irmãos, Kovacic & Vlaisavljevic observaram melhora em todas as fases do desenvolvimento embrionário – desde D2 até D5 – em baixas concentrações de O₂, identificada através do escore embrionário, do desenvolvimento da massa celular interna, da compactação em mórula e da proporção de embriões em estágio de blastocisto, não verificando diferença se FIV convencional ou com injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI). Com transferência embrionária realizada apenas em blastocisto, os resultados clínicos evidenciaram uma tendência de melhora em baixa concentração de O₂, porém sem diferença significativa, provavelmente pela pequena amostra do estudo (Kovacic & Vlaisavljevic, 2008). De maneira semelhante, Ciray *et al* usaram modelo de oócitos irmãos, verificando melhor qualidade dos embriões tanto no 3º quanto no 5º dia de desenvolvimento (Ciray *et al*, 2009).

Meintjes *et al* cultivaram embriões em 5% de O₂ com predominância da transferência em blastocisto, resultando em taxas mais elevadas de implantação, de implantação por nascido vivo, de gravidez clínica e de nascidos vivos (Meintjes *et al*, 2009). Observaram ainda uma maior quantidade de embriões congelados em blastocisto, tanto das pacientes com transferência em D3 quanto em D5, porém sem significância estatística devido a pequena amostra resultante (Meintjes *et al*, 2009). Além disso, Nanassy *et al*, cultivou embriões humanos em condições atmosféricas de O₂ até o 3º dia, passando a cultivá-los em dois grupos – 5% ou 20% – até o 5º dia de desenvolvimento, não observando efeitos benéficos nos

estágios avançados do desenvolvimento embrionário (Nanassy *et al*, 2010). Esses resultados sugerem que o efeito benéfico da hipóxia no desenvolvimento embrionário ocorreria ao longo de todas as fases de cultivo *in vitro*, desde oócito antes da fertilização até o estágio de blastocisto (García *et al*, 2010).

Contribuindo com esses dados, Waldenström *et al* (2009) compararam concentração atmosférica e baixa concentração de O₂ em estudo com transferência apenas de blastocistos, observando, com significância, maior desenvolvimento de blastocisto por oócito fertilizado e maior média de blastocistos criopreservados, bem como maior taxa de gravidez, gestação viável e nascidos vivos. Esse estudo acrescenta, ainda, que o cultivo de embriões em concentração fisiológica de O₂ parece ser a melhor alternativa para criopreservação de embriões.

Estudos mais recentes sugerem que a baixa concentração de O₂ pode ter uma aplicabilidade maior com significante melhora dos resultados clínicos em FIV/ICSI em grupos específicos, como más respondedoras (Kovacic *et al*, 2010) ou mulheres com idade superior há 40 anos (García *et al*, 2010). Kovacic *et al* (2010) realizaram estudo apenas com oócitos irmãos em ciclos de ICSI, dividido em três grupos de mulheres: (1) ótimas respondedoras; (2) más respondedoras; e (3) com idade superior há 40 anos (Kovacic *et al*, 2010). Observaram maior quantidade de embriões usados clinicamente, maior quantidade de blastocistos congelados por embriões clivados e maior taxa cumulativa de gravidez. Destacaram-se no grupo de más respondedoras as taxas superiores de gravidez bioquímica, clínica e em curso, seja por ciclo ou transferência realizada em D3. Em outro estudo, García *et al* (2010) também dividiram as pacientes em três grupos: (1) < 35 anos; (2) entre 35 a 39 anos; e ≥ 40 anos; embora não tenham observado diferenças entre os grupos, destacaram as taxas de implantação, gravidez clínica e nascimento por transferência, além do número de gestações em curso

significativamente superiores em baixas concentrações de oxigênio, apesar da pequena amostra (García *et al*, 2010).

Pelo exposto, é plausível argumentar que o embrião humano não seja tão sensível à toxicidade do oxigênio nos estágios precoces de desenvolvimento (Bavister, 2004). Assumindo que a massa celular interna do blastocisto é bom marcador da qualidade embrionária e é reduzida preferencialmente em concentrações suprafisiológicas de oxigênio (Bavister, 2004; Karangenc *et al*, 2004) parece lógico fazer transferência embrionária precoce – em D2 ou D3 – para impedir os danos do oxigênio em FIV de embriões humanos, e somente realizar cultura de embriões em baixas concentrações de oxigênio se passar de três dias de cultivo ou quando se pensar em congelamento embrionário (Meintjes *et al*, 2009). Entretanto, essa estratégia parece perigosa, pois os efeitos deletérios do oxigênio podem já estar presentes no embrião precocemente, apesar de só se manifestar no estágio de blastocisto ou mais tardiamente, comprometendo os resultados clínicos (Pabon *et al*, 1989; Bavister, 2004; Meintjes *et al*, 2009).

Finalmente, deve-se enfatizar que as evidências experimentais demonstram que a capacidade de embriões para desenvolver a blastocistos não indica necessariamente uma ausência de toxicidade de oxigênio e suas anormalidades associadas em propriedades da célula, tais como alteração do metabolismo e expressão gênica (Bavister, 2004).

DISCUSSÃO

Os efeitos negativos do oxigênio podem ser potencialmente reduzidos pela adição de neutralizadores de radicais livres e antioxidantes para meios de cultivo (Umaoka *et al*, 1991; Umaoka *et al*, 1992), ou reduzindo a concentração de oxigênio (Dumoulin *et al*, 1999). Na época dos primeiros experimentos, não se comprovaram benefícios clínicos com baixas concentrações de oxigênio para cultivo de embriões humanos (Dumoulin *et al*, 1999) e, por isso, alguns autores optaram por adicionar antioxidantes aos meios de cultivo embrionário (Umaoka *et al*, 1991; Catt & Henman, 2000). Se os efeitos nocivos das concentrações suprafisiológicas de oxigênio em embriões humanos foram neutralizados de forma confiável e inócua pela adição de antioxidantes, esta pode ser uma alternativa menos dispendiosa e laboriosa (Meintjes *et al*, 2009). Entretanto, intuitivamente, parece mais racional evitar a formação de agentes prejudiciais em torno de embriões em desenvolvimento precocemente através de cultivo em concentrações reduzidas de oxigênio, em vez de tentar neutralizar esses agentes após sua formação (Meintjes *et al*, 2009). Além disso, alguns tipos de dano embrionário, como as interferências sobre a expressão gênica, não podem ser evitados pela simples adição de antioxidantes (Harvey *et al*, 2004; Meintjes *et al*, 2009).

Os modelos de incubadoras para cultivo de embriões usados comumente nos centros de reprodução assistida não são ideais para essa finalidade, pois proporcionam concentração atmosférica com 5% de CO₂ e aproximadamente 19% de O₂ (Bavister & Poole, 2005). Para alcançar baixas concentrações de oxigênio na incubadora é necessário um sensor de O₂ e CO₂, que por causa do grande volume da câmara vai requerer por sua vez uma prodigiosa quantidade de N₂ e tempo para expulsar O₂ (Bavister & Poole, 2005). Assim, o custo do gás N₂ torna-se substancial, porque cada vez que a porta da incubadora é aberta, o ambiente dentro da câmara tem que ser reabastecido com N₂ para reduzir a concentração de O₂

novamente (Bavister & Poole, 2005). Assim, o interesse em reduzir custos favorece a utilização do modelo padrão de incubadora, apesar do conhecimento das concentrações fisiológicas de oxigênio no aparelho reprodutor feminino (Fischer & Bavister, 1993; Bavister & Poole, 2005). Este dilema entre fatores econômicos e condições ideais de cultura pode ser resolvido de maneira simples, segura e barata com incubadoras que utilizem fluxo contínuo de gás, como mini-incubadoras (Cooke *et al*, 2002; Bavister, 2004; Fujiwara *et al*, 2007) ou sacos selados com gás impermeável (Bavister, 2004; Bavister & Poole, 2005). A mini-incubadora (K-MINC-1000, COOK, Co., Australia) é uma câmara de bancada pequena, que possui aquecedores em cima e em baixa de cada prato para controle direto das condições de cultivo (Fujiwara *et al*, 2007).

Cabe ressaltar que o processo de congelamento e descongelamento embrionário deixa as células mais suscetíveis aos RLO que podem levar a modificações na estrutura espacial da membrana lipídica (Guérin *et al*, 2001). Os embriões também podem ter sensibilidade diferente aos RLO em diferentes estágios de desenvolvimento que são decorrentes das variações nos limiares do mecanismo de defesa (Guérin *et al*, 2001).

É importante observar que redução drástica na concentração de oxigênio *in vitro* também pode ter consequências negativas (Vajta *et al*, 2010). Estudos mostraram que concentração de oxigênio em 2%, embora aumente a taxa de blastocisto, pode causar malformações no desenvolvimento de ruminantes (Thompson & Peterson, 2000).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados disponíveis na literatura levam a crer em resultados reprodutivos mais favoráveis a partir do cultivo de embriões a concentrações baixas de oxigênio, o que se deve principalmente à diminuição dos efeitos negativos do estresse oxidativo sobre o metabolismo e o desenvolvimento embrionário.

Embora os vastos dados obtidos a partir de embriões de roedores, bovinos e primatas não possam ser seguramente extrapolados para embriões humanos, os poucos estudos em nossa espécie sugerem resultados semelhantes e é plausível imaginar melhores resultados clínicos de FIV/ICSI pelo cultivo em concentrações de oxigênio mais próximas do que seriam níveis fisiológicos.

Respeitando os limites éticos, espera-se que estudos bem desenhados no futuro somem dados aos até então disponíveis, que forneçam as evidências necessárias à mudança dos padrões de concentração atmosférica de oxigênio utilizados mais comumente em laboratório de reprodução assistida nos dias de hoje.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bahçeci M, Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F. Effect of oxygen concentration during the incubation of embryos of women undergoing ICSI and embryo transfer: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(4):438-43.

Batt PA, Gardner DK, Cameron AW. Oxygen concentrations and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 1991;3:601-7.

Bavister B. Oxygen concentration and preimplantation development. *Reprod Biomed Online*. 2004;9(5):484-6.

Bavister BD, Poole KA. Duration and temperature of culture medium equilibration affect frequency of blastocyst development. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(1):124-9.

Bayatt-Smith JG, Leese HJ, Gosden RG. An investigation by mathematical modeling of whether mouse and human preimplantation embryos in static culture can satisfy their demands for oxygen by diffusion. *Hum Reprod*. 1991;6:52-7.

Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod*. 2000;15(Suppl.2):199-206.

Ciray HN, Aksoy T, Yaramanci K, Karayaka I, Bahceci 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.

Cooke S, Tyler JPP, Driscoll G. Objective assessments of temperature maintenance using in vitro culture techniques. *J Assist Reprod Genet*. 2002;19:368-75.

Dumoulin JCM, Meijers CJJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JPM, Evers JLH. Effect of oxygen concentration on human *in vitro* fertilization and embryo culture. *Hum Reprod.* 1999;14(2):465-9.

Dumoulin JCM, Vanvuchelen RCM, Land JA *et al.* 1995 Effect of oxygen concentration on *in vitro* fertilization and embryo culture in the human and the mouse. *Fertility and Sterility* **63**, 115–119.

Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil.* 1993;99:673-9.

Fujiwara M, Takahashi K, Izuno M, Duan YR, Kazono M, Kimura F, Noda Y. Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after *in-vitro* fertilization: comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24:5-9.

García JI, Sepúlveda S, Noriega-Hoces L. Beneficial effect of reduced concentration with transfer of blastocysts in IVF patients older than 40 years old. *Health.* 2010;2(9):1010-17.

Garris DR, Mitchell JA. Intrauterine oxygen tension during the estrous cycle in the Guinea Pig: Its relation to uterine blood volume and plasma estrogen and progesterone levels. *Biol Reprod.* 1979;21:149-59.

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.

Guérin P, Mouatassim SEI, Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryos and its surroundings. Hum Reprod Update. 2001;7(2):175-89.

Hammer RE, Goldman H, Mitchell JA. Effects of nicotine on uterine blood flow and intrauterine oxygen tension in the rat. J Reprod Fertil. 1981;63:163-8.

Harlow GM, Quinn P. Foetal and placental growth in the mouse after pre-implantation development in vitro under oxygen concentrations of 5% and 20%. Austr J Biol Sci. 1979;32:363-9.

Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. Biol Reprod. 2004;71:1108-19.

Iwata H, Minami N, Imai H. Postnatal weight of calves derived from in vitro matured and in vitro fertilized embryos development under various oxygen concentrations. Reprod Fertil Dev. 2000;12:391-6.

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(4):409-17.

Karja NW, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T. Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine in vitro fertilized embryos. Theriogenology. 2004;62:1585-95.

Kea B, Gebhardt J, Watt J, Westphal LM, Lathi RB, Milki AA, Behr B. Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of *in vitro* fertilization. Fertil Steril. 2007;87(1):213-6.

Kovacac B, Sajko MC, Vlaisavljevic V. A prospective, randomized trial on the effect on atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome on intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 2010;94(2):511-9.

Kovacac 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(2):229-36.

Kwon HC, Yang HW, Hwang KJ, Yoo JH, Kim MS, Lee CH, Ryu HS, Oh KS. Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured *in vitro*. *J Obstet Gynaecol Res*. 1999;25:359-66.

Leoni GG, Rosati I, Succo S, Bogliolo L, Bebbere D, Berlinguer F, Ledda S, Naitana S. A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation on *in vitro* produced ovine blastocysts. *Reprod Domestic Anim*. 2007;42:299-304.

Mastroianni Jr L; Jones R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fertil*. 1965;9:99-102.

McKiernan SH, Bavister BD. Environmental variables influencing *in vitro* development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol Reprod*. 1990;43: 404-13.

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(2):300-7.

Nanassy L, Peterson CA, Wilcox AL, Peterson CM, Hammoud A, Carrell DT. Comparison of 5% and ambient oxygen during days 3-5 of in vitro culture of human embryos. *Fertil Steril*. 2010;93(2):579-85.

Pabon JE Jr, Findley WE, Gibbons WE. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril*. 1989;51:896-900.

Thompson JG, Peterson AJ. Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. *Hum Reprod*. 2000; 15(Suppl.5),56-67.

Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T. Developmental potentiality of embryos cultured under low oxygen tension with superoxide dismutase. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1991;8:245-9.

Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev*. 1992;31:28-33.

Vajta G, Rienzi L, Cobo A, Yovich J. Embryo culture: can we perform better than nature? *Reprod Biomed Online*. 2010;20(4):453-69.

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(6):2461-5.

Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FOJ, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman LJ. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology*. 2003;59:1585-96.

Capítulo II

IVF/ICSI outcomes after human embryo development at low oxygen tension: a meta-analysis

Padronizado de acordo com as normas de publicação da revista a que foi enviado: Reproductive Biology and Endocrinology

IVF/ICSI outcomes after human embryo development at low oxygen tension: a meta-analysis

David Barreira Gomes Sobrinho¹, Joao Batista A Oliveira^{1,2,3*}, Claudia G Petersen^{1,2,3}, Ana L Mauri^{2,3}, Liliane F I Silva^{1,2,3}, Fabiana C Massaro^{2,3}, Ricardo LR Baruffi^{2,3}, Mario Cavagna^{2,3}, José G Franco Jr^{1,2,3}

¹Department of Gynaecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, Brazil

²Center for Human Reproduction Prof. Franco Jr., Ribeirao Preto, Brazil

³Paulista Centre for Diagnosis, Research and Training, Ribeirao Preto, Brazil

*Corresponding author

E-mail addresses

DBGS: barreira.md@gmail.com

JBAO*: joabatista@crh.com.br

CGP: petersenclaudia@crh.com.br

ALM: analucia@crh.com.br

LFIS: liliane@crh.com.br

FCM: fabiana@crh.com.br

RLRB: baruffir@crh.com.br

MC: mariocavagna@crh.com.br

JGF: crh@crh.com.br

Abstract

Background: Improved pregnancy, implantation, and birth rates have been reported after the use of a reduced O₂ concentration during embryo culture, mainly due to a reduction of the cumulative detrimental effects of reactive oxygen species. However, some studies have failed to report any positive effects. The objective of this meta-analysis was to evaluate the effect of a low-O₂ environment on IVF/intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcomes.

Methods: All available published and ongoing randomised trials comparing the effects of low (~5%; OC~5) and atmospheric (~20%; OC~20) oxygen concentrations on IVF/ICSI outcomes were included. Search strategies included online surveys of databases from 1980 to 2011. The outcomes measured were fertilisation rate, implantation rate and ongoing pregnancy rates. The fixed effects model was used to calculate the odds ratio.

Results: The pooled fertilisation rate did not differ significantly ($P=0.54$) between the group of oocytes cultured at low O₂ tension and the group at atmospheric O₂ tension. Concerning all cycles, the implantation ($P=0.06$) and ongoing pregnancy ($P=0.06$) rates were not significantly different between the group receiving transferred sets containing only OC~5 embryos and the group receiving transferred sets with only OC~20 embryos. In a meta-analysis performed for only those trials in which embryos were transferred on day 2/3, implantation ($P=0.63$) and ongoing pregnancy ($P=0.19$) rates were not significantly different between the groups. In contrast, when a meta-analysis was performed using only trials in which embryos were transferred on days 5 and 6 (at the blastocyst stage), the group with transferred sets of only OC~5 embryos showed a statistically significantly higher implantation rate ($P=0.006$) than the group receiving transferred sets with only OC~20 embryos, although the ongoing pregnancy ($P=0.19$) rates was not significantly different between the groups.

Conclusions: Despite some promising results, it seems premature to recommend the use of low O₂ tension for oocyte and embryo culture. Additional randomised controlled trials are necessary before evidence-based recommendations can be provided.

Keywords: low oxygen, embryo culture, gas atmosphere, IVF/ICSI.

Background

The role of oxygen tension during the culture of gametes and embryos has been the subject of study in both animals and humans. Following protocols from somatic cell culture techniques, the embryos of humans and other mammals have traditionally been cultured under atmospheric oxygen tension (~20%). However, experimental studies in various species of mammals have revealed that the concentration of O₂ inside the uterus and oviducts usually fluctuates in the range of 2–8% [1-5]. Culture at low levels of O₂ (5–7%) can improve embryonic development in several species, including mice [6-10], rats [11], hamsters [12], rabbits [13], pigs [14], goats [15], sheep [16, 17], and cattle [16, 18]. In addition, culture at low O₂ concentration is associated with a reduced rate of aneuploidy in mouse embryos [19].

In general, these results are associated with a reduction of the harmful effects of reactive oxygen species (ROS). In oocytes and embryos, even with endogenous defence mechanisms [20, 21], disturbances in physiological processes can lead to an increase in the generation and accumulation of ROS, which is associated with various degrees of cell damage (DNA fragmentation, changes in gene expression and organelle and membrane disturbances) [7, 21-25]. Consequently, interrupted or delayed embryonic development, embryonic fragmentation, apoptosis or health impairment during pregnancy can be observed [21, 26-28]. ROS may originate either directly within gametes and embryos (by different enzymatic mechanisms) or from the environment in which they are located [20]. In contrast, the *in vitro* manipulation of gametes in embryos favours the generation of ROS, as it involves the exposure of eggs and embryos to xenobiotics, disturbed concentrations of metabolic substrates, traces of transitional elements, light and high oxygen concentrations [20].

Assuming that, in humans, physiological hypoxia also exists in the female genital tract, these results from animal experiments have important implications for the clinical

application of IVF/intracytoplasmic sperm injection (ICSI). As reported in animal experiments, beneficial effects of reduced O₂ levels have also been observed in human studies [28-32], including a greater rate of embryonic development up to the blastocyst stage, a faster cleavage rate, an increased blastulation rate, an increase in the number of blastocyst cells and in the number of cryopreserved blastocysts, and an increase in the proportion of high-quality blastocysts. Regarding clinical outcomes, some studies have reported improvements in the implantation rate, pregnancy rate, delivery and live births [21, 25, 31] with low O₂ concentrations, compared with atmospheric concentrations. Conversely, other randomised studies have failed to yield positive results, reporting no differences in the implantation and pregnancy rates [29, 32-34]. Seeking to understand the influence of O₂ tension in oocyte and embryo cultures, this meta-analysis aimed to evaluate the effect of a low-O₂ environment on IVF/ICSI outcomes.

Methods

Criteria for including studies in this meta-analysis

All available published and ongoing randomised controlled trials comparing the effect of low (~5%; OC~5) and atmospheric (~20%; OC~20) oxygen concentrations on IVF/ICSI outcomes were included. Frozen embryo replacement cycles were not included.

Outcome measures

The outcome measures used for this meta-analysis were fertilisation rate, implantation rate and ongoing pregnancy rate (OPR) per transfer.

Identification of studies

Search strategies included online surveys of the MEDLINE, EMBASE, Science Citation Index, Cochrane Controlled Trials Register and Ovid databases for publications in the years 1980 to 2011. There was no language restriction, and grey literature was included. The following medical subject headings and text words were used: embryo culture, preimplantation development, embryo development, low oxygen, oxygen concentration, oxygen, gas atmosphere, IVF, ICSI, randomised study. The principal inclusion criterion was a randomised controlled trial (RCT).

Search results

Among the 13 potentially relevant studies retrieved, a total of seven trials fulfilled the inclusion criteria [25, 28-30, 32-34]. A flow diagram of the selection process is shown in Fig 1.

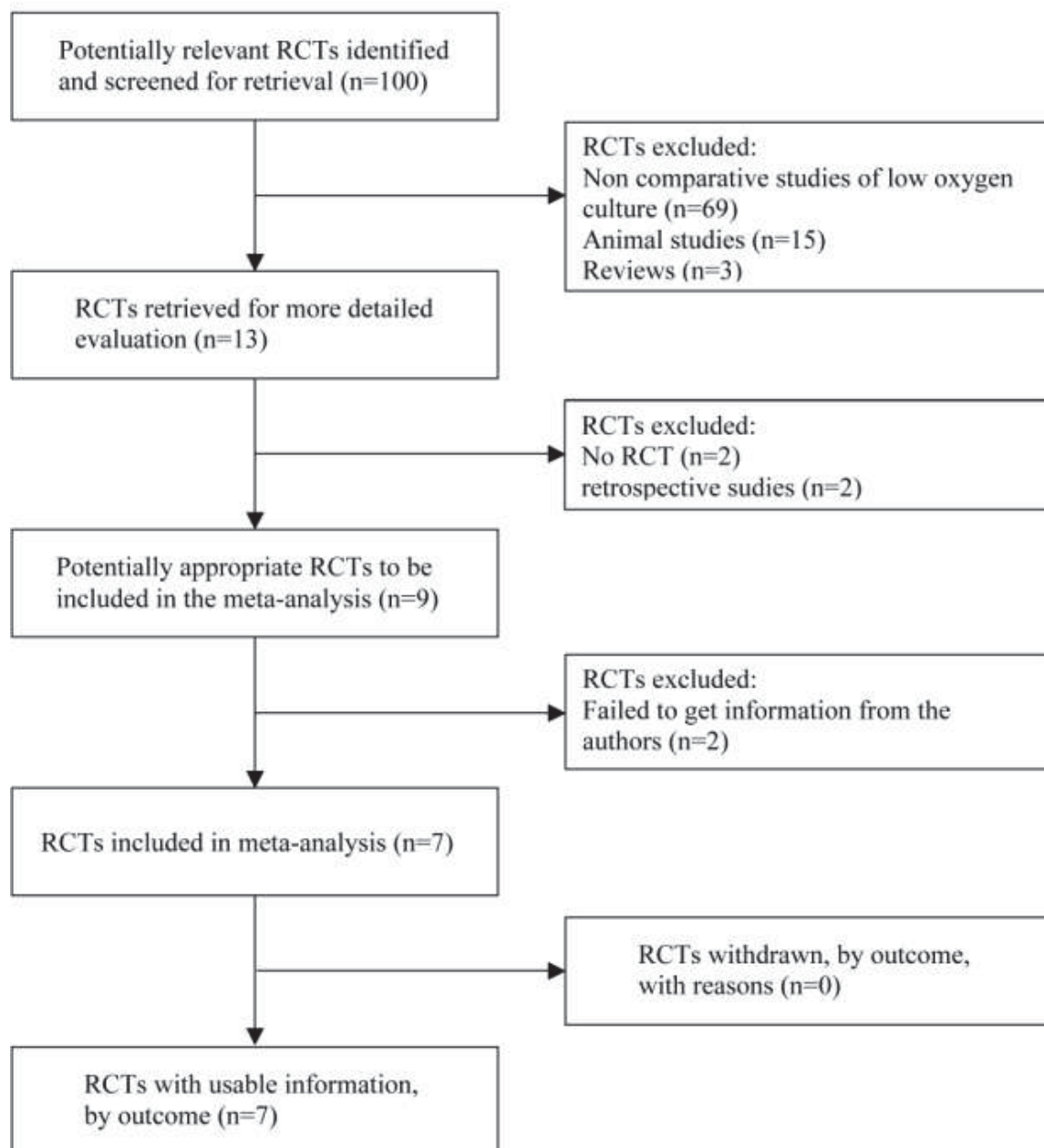


Figure 1. QUOROM statement flow diagram illustrating selection of trials included in the meta-analysis. RCT: randomised controlled trial.

Validity assessment and data extraction

Each trial was assessed independently by four reviewers (DBGS, JBAO, RB and JGF) and ranked for its methodological rigor and its potential for the introduction of bias. Missing data were obtained from the authors when possible.

Study descriptions

The main characteristics of the included trials are summarised in Table 1; below are brief descriptions of each study.

Dumoulin et al., 1999 [29]: In this prospective randomised study of 1,380 consecutive IVF treatments, the authors compared the results of culturing human oocytes and embryos for the first 2 or 3 days of development in microdroplets of medium under oil, using a gas phase containing either an atmospheric (~20% / 690 cycles) or a reduced (5% / 690 cycles) O₂ concentration. No significant differences were found between the two groups, cultured under 5% or 20% O₂, in their rates of fertilisation (60 versus 61%, respectively), embryo development at day 2 or 3, pregnancy (26.6 versus 25.4%, respectively), or implantation (13.4 versus 14.0%, respectively). The culture of surplus embryos under 5% O₂ resulted in a significantly higher mean incidence of blastocyst formation per cycle compared with the 20% O₂ group (25.8±2.0 versus 20.4±1.9, respectively). The mean number of embryos classified as blastocysts by microscopic observation of a blastocoele was significantly higher in the 5% O₂ group than in the 20% O₂ group, both in blastocysts fixed on day 5 (39.8±1.7 versus 31.9±1.9, respectively) and those fixed on day 6 (45.6±2.6 versus 33.7±3.4, respectively). The authors concluded that although culture under 5% O₂ led to slightly improved preimplantation embryonic viability, this effect was either too marginal to result in higher

pregnancy rates or low O₂ concentrations exert an effect during the later stages of preimplantation development only.

Bahçeci et al., 2005 [34]: In this prospective randomised study, the authors tested the hypothesis that ICSI outcomes can be improved by culturing human embryos in an atmosphere of controlled O₂ concentration and compared 5% O₂ with 20%. From a total of 822 oocyte retrieval cycles, 712 resulted in embryo transfers, of which 255 were transferred at day 2 and 457 were transferred at day 3. Of the 255 day 2 transfers, oocytes and embryos from 118 cycles were incubated in 5% O₂ and 137 were in 20% O₂. Of the 457 day 3 transfers, oocytes and embryos from 219 cycles were incubated in 5% O₂ and 238 in 20% O₂. The cycle characteristics and the embryology parameters were similar between groups. The embryo qualities were similar with day 2 transfers; however, they were better with day 3 transfers incubated in 5% O₂ than in 20% O₂. The clinical outcome parameters did not differ between groups with respect to the O₂ concentration. The authors concluded that culture of embryos under atmospheric O₂ concentration for the first 2 or 3 days did not alter the clinical outcomes in ICSI cycles.

Kea et al., 2007 [33]: In this study, the effects of two standard oxygen concentrations, physiological (5% O₂, 5% CO₂, and 90% N₂ / 49 patients) and atmospheric (5% CO₂ with the balance air / 57 patients), on fertilisation, embryo development, and pregnancy rate were compared in patients undergoing IVF. No significant differences were noted in the number of patients, patient age, infertility procedures, total number of eggs, total number of 2PNs, fertilisation rate, average number of embryos transferred, and pregnancy outcomes between the groups receiving embryos cultured under the different gas phases. The embryo quality of

the day 3 ET groups did show a significant difference between the gas phases ($P=.0057$), implying improved embryo development under physiological conditions (5% O₂). However, the embryo quality in the day 5 ET groups showed no significant differences. Only 21% of the patients in this study were eligible for blastocyst transfer. The percentage of patients who had ET on day 5 was 20% in the physiological O₂ group and 21% in the atmospheric O₂ group. In the patients eligible for blastocyst transfer, there were no significant differences between the gas-phase groups in any of the parameters. The authors concluded that the differences in oxygen concentration did not significantly affect the fertilisation rate, blastocyst formation, or the pregnancy rate, but there was a significant difference in mean embryo scores between the physiological and atmospheric groups on day 3.

Kovacic & Vlaisavljević, 2008 [28]: Using sibling human oocytes, this prospective study analysed the effects of 5% and 20% oxygen on the prolonged development of embryos. The outcomes measured were fertilisation rate and the proportion of morphologically optimal embryos, blastocysts and optimal blastocysts developed by day 5. The results were analysed separately for the groups on IVF ($n = 988$ oocytes) and ICSI ($n = 928$ oocytes) cycles. It was found that low oxygen did not influence fertilisation, but, in comparison with 20% oxygen, it resulted in a significantly higher proportion of embryos being optimal on day 3 after IVF (59 versus 43.2%; $P < 0.001$) and after ICSI cycles (51.2 versus 28.5%; $P < 0.001$). For both methods, the lower oxygen concentration improved the blastulation rate (73.2 versus 63.1%; $P < 0.05$ and 67.4 versus 54.7%; $P < 0.001$) and increased the proportion of embryos reaching the stage of expanded blastocyst with a normal inner cell mass on day 5 (31.1 versus 14.6%; $P < 0.001$ and 18.9 versus 11.4%; $P < 0.01$). The ratio of successful embryo

development to optimal blastocyst stage on day 5 of culture calculated for the two oxygen concentrations was 2.1 for IVF and 1.7 for ICSI, clearly favouring lower oxygen tension.

Ciray et al., 2009 [30]: This study was designed to test the hypothesis that physiologic oxygen concentration improved blastocyst yield and quality in human embryo culture. A total of 75 oocyte-retrieval cycles were studied, of which 74 resulted in embryo transfer. This study was conducted with sibling oocytes in which human gametes and embryos were cultured at physiologic conditions (6% CO₂ + 5% O₂ + 89% N₂ / 868 oocytes) from insemination to day 6 or at atmospheric conditions (6% CO₂ in air / 860 oocytes) until day 3 and at physiologic conditions afterward. All oocytes in the control (atmospheric O₂) and study (5% O₂) groups were subjected to ICSI. The results showed that physiologic oxygen concentration throughout the culture period improved total blastocyst yield and embryo quality at day 5 and day 3.

Meintjes et al., 2009 [25]: The objective of this study was to evaluate the effect of lowered incubator O₂ tension on live birth rates in a predominately Day 5 embryo transfer program. Two hundred and thirty first-cycle women undergoing routine IVF or ICSI with ejaculated sperm were randomised in a prospective clinical trial and stratified by patient age and physician. The patients' embryos were randomly assigned for culture in either a 21% O₂ (atmospheric) or a 5% O₂ (reduced oxygen) environment. The clinical endpoints monitored were the rates of implantation, clinical pregnancy, live birth and blastocyst cryopreservation. The results showed that embryos cultured in a 5% O₂ environment consistently resulted in higher rates of implantation (106/247, 42.9% versus 82/267, 30.7%; a difference of 12.2% and a 95% confidence interval (CI) of 3.9–20.3, P = 0.005) and live births (66/115, 57.4%

versus 49/115, 42.6%; a difference of 14.8% with a 95% CI of 1.9 –27.0%, $P = 0.043$) when compared with rates among women whose embryos were cultured in an atmospheric O_2 environment. The authors concluded that the overall increase in live births reported by this study indicates that the effort and expense of culturing embryos in a low- O_2 environment is justified.

Kovacic et al., 2010 [32]: In this prospective randomised trial, the authors aimed to determine whether embryo cultivation at different oxygen tensions had any effect on ICSI outcome. A total of 647 patients were screened for eligibility, and all of them proceeded to randomisation. In 326 patients, the oocytes were assigned to the 5% oxygen treatment (at 6% CO_2 , 5% O_2 , and 89% N_2) and the oocytes received the 20% oxygen treatment (6% CO_2 in air) for 321 patients. It was observed that although low oxygen resulted in a higher proportion of good day 2 embryos and optimal blastocysts, the rates of ongoing pregnancy (31.6% vs. 27.1%) and implantation (28.8% vs. 25.2%) were similar in both treatment groups. However, low oxygen resulted in a higher cumulative pregnancy rate (38% vs. 28.3%) in the main group (all patients) and a higher pregnancy rate in the poor-responder subgroup (23% vs. 9.8%), with embryo transfers performed mostly on day 3. The authors concluded that the use of reduced oxygen in IVF is reasonable, irrespective of the duration of embryo culture.

Statistical analysis

Data management and analysis were conducted using the StatsDirect statistical software (Cheshire, UK). The fixed effect model was used for the odds ratio (OR), and the effectiveness was evaluated by the Mantel-Haenszel method. A confidence interval (CI) was calculated using the variance formula of Robins, Breslow and Greenland. A chi-squared test

statistic was used with its associated probability that the pooled OR was equal to 1. The measure of heterogeneity (non-combinability) was evaluated using Cochran's Q, the Breslow-Day and I^2 (inconsistency) tests. A nonsignificant result (i.e., a lack of heterogeneity) indicated that no trial had an OR significantly worse or better than the overall common OR obtained by pooling the data. Because a fixed effects model was employed herein, it is important to acknowledge that inferences refer only to the particular studies included in the analysis. Meta-analysis used in this manner is simply a device to pool the information from the various studies and so provide a composite finding, but this finding is only for those studies. Because many of the preceding analyses contained only two or three studies, we decided to derive the inferences from a fixed-effects model.

Results

Fertilisation rate (Figure 2)

Six studies were included [25, 28, 30, 32-34]. The pooled fertilisation rates did not differ significantly between the group of oocytes that was cultured at OC~5 (73%, 7,066/9,682) and the group cultured at OC~20 (72.5%, 7,495/10,342) ($P=0.54$; OR=1.02, 95% CI=0.96–1.09). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day = 2.42, $df = 5$, $P = 0.79$; Cochran's $Q = 2.42$, $df = 5$, $P = 0.79$; $I^2 = 0\%$, 95% CI = 0% to 61%).

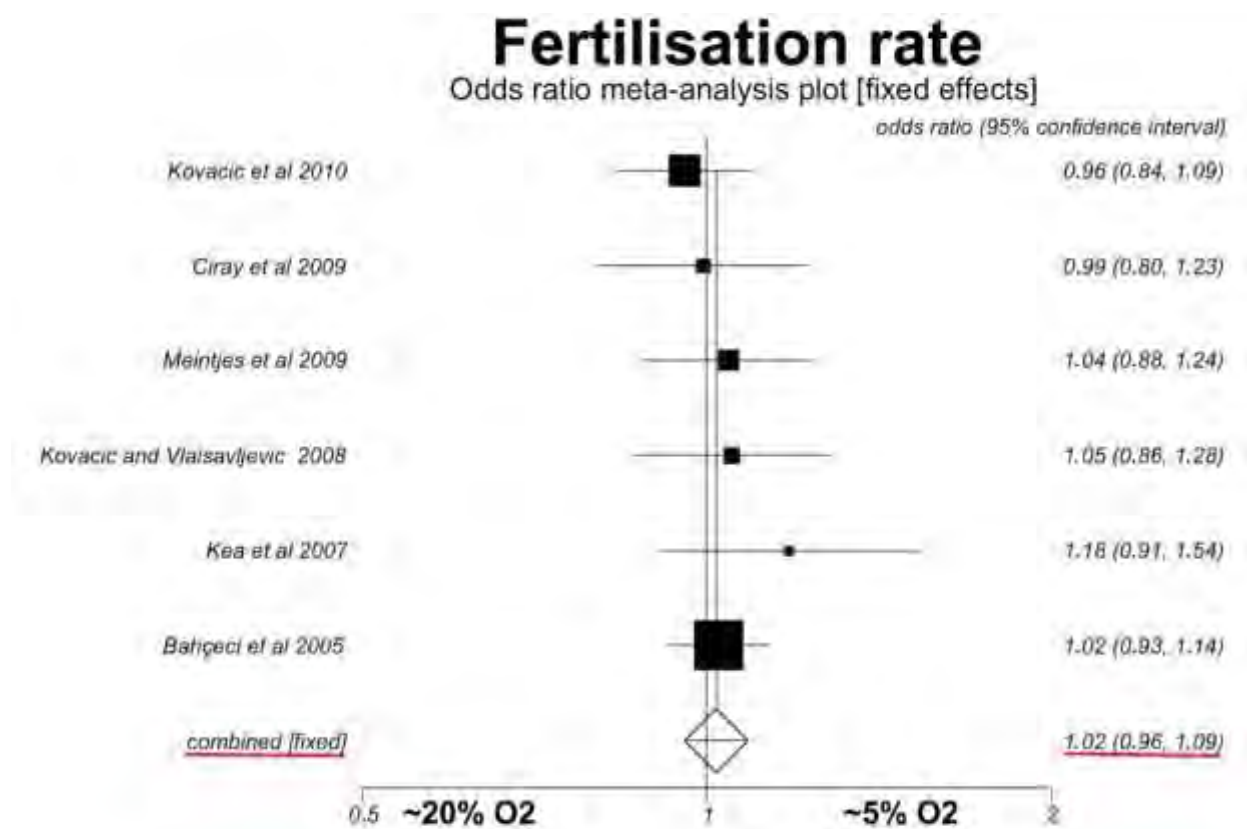


Figure 2. Fixed-effect model. Forest plot for fertilisation rate.

Implantation rate (Figure 3)

Four studies were included [25, 29, 32, 34]. The pooled implantation rates did not differ between the group of patients that received sets with only OC~5 embryos (22.1%, 768/3,468) and the group receiving only OC~20 embryos (20.6%, 739/3,590) ($P=0.06$; OR=1.12, 95% CI=1.00-1.26). There was heterogeneity in this comparison (Breslow-Day = 9.64, df = 3, $P = 0.02$; Cochran's $Q = 9.60$, df = 3, $P = 0.020$; $I^2 = 68.8\%$, 95% CI = 0% to 87.1%).

Similarly, when a meta-analysis was performed only with cycles in which embryos were transferred on day 2 or 3 [25, 29, 32, 34], the implantation rates were not significantly different between transferred sets with only OC~5 embryos (18.2%, 540/2,961) and sets with only OC~20 embryos (18%, 557/3,085) ($P=0.63$; OR=1.04, 95% CI=0.91–1.18). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day = 1.89, df=3, $P = 0.59$; Cochran's $Q = 1.89$, df = 3, $P = 0.59$; $I^2=0\%$, 95% CI= 0%–67.9%).

However, when a meta-analysis was performed only with cycles in which embryos were transferred at the blastocyst stage [25, 32], the implantation rates were significantly different between transferred sets with only OC~5 embryos (45%, 228/507) and sets with only OC~20 embryos (36%, 182/505) ($P=0.006$; OR=1.44, 95% CI=1.12–1.86). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day = 2.38, df=1, $P = 0.12$; Cochran's $Q = 2.39$, df = 1, $P = 0.12$).

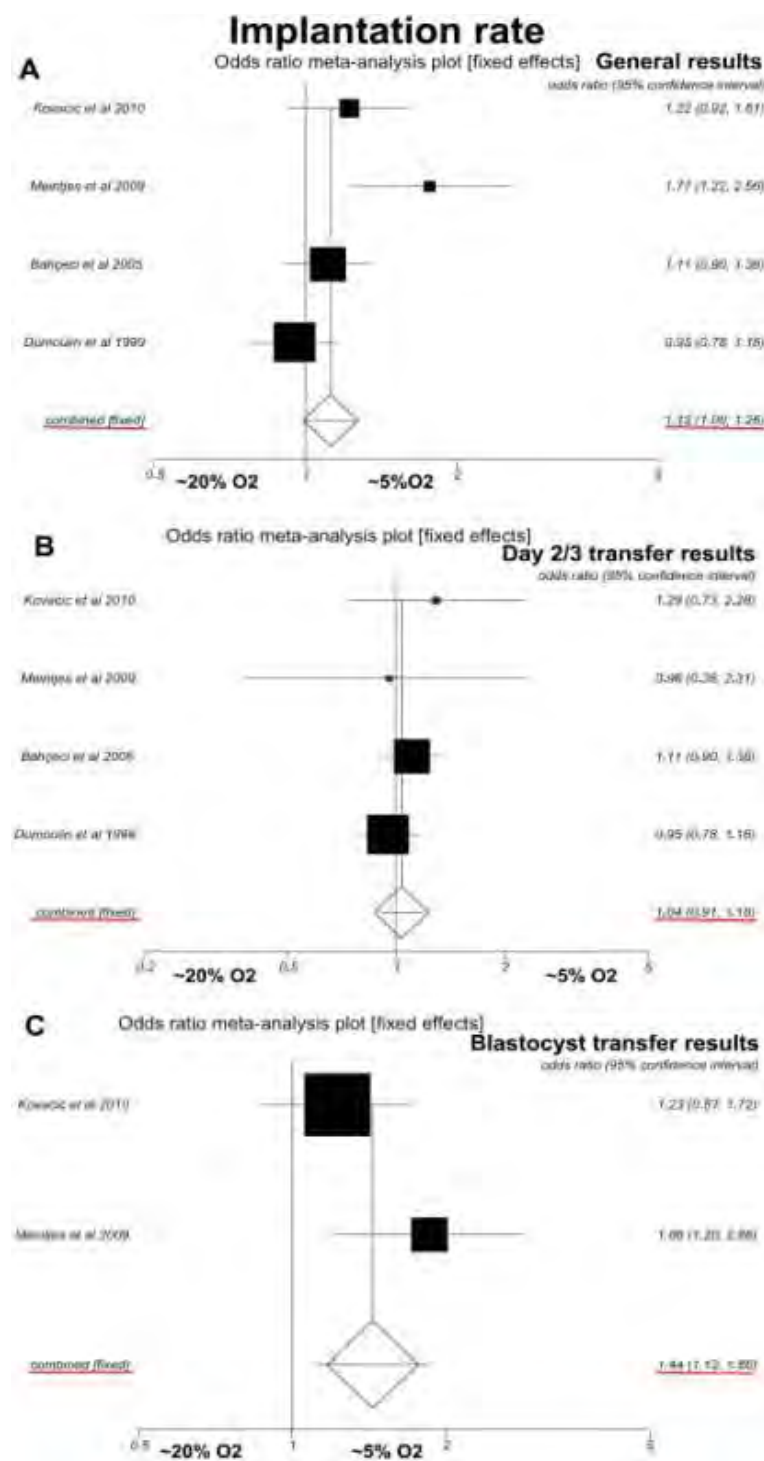


Figure 3. Fixed-effect model. Forest plot for implantation rate. A: All cycles; B: Only cycles in which embryos were transferred on day 2 or 3; C: Only cycles in which embryos were transferred at the blastocyst stage.

Ongoing pregnancy rate (OPR) per transfer (Figure 4)

Four studies were included [25, 29, 32, 34]. Concerning all cycles, the pooled OPR per transfer did not differ between the group of patients that received sets with only OC~5 embryos (34.6%, 484/1,398) and the group receiving sets with only OC~20 embryos (31.6%, 450/1,423) ($P=0.06$; $OR=1.18$, 95% $CI=1.00-1.38$). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day = 3.90, $df = 3$, $P = 0.27$; Cochran's $Q = 2.890$, $df = 3$, $P = 0.27$; $I^2 = 23\%$, 95% $CI=0\%$ to 74.7%).

Similarly, in the subgroup of cycles in which embryos were transferred on day 2 or 3 [25, 29, 32, 34], the pooled OPR per transfer did not differ significantly between the group of patients that received sets with only OC~5 embryos (31.1%, 349/1,121) and the group receiving sets with only OC~20 embryos (29.2%, 338/1,159) ($P=0.19$; $OR=1.13$, 95% $CI=0.94-1.36$), a comparison without heterogeneity (Breslow-Day = 3.12, $df = 3$, $P = 0.37$; Cochran's $Q = 3.09$, $df = 3$, $P = 0.37$; $I^2 = 3.1\%$, 95% $CI= 0\%$ to 68.9%).

Additionally, when meta-analysis was performed only with cycles in which embryos were transferred at the blastocyst stage [25, 32], the OPR per transfer was again not significantly different between transferred sets with only OC~5 embryos (48.7%; 135/277) and sets with only OC~20 embryos (42.4%, 112/264) ($P=0.19$; $OR=1.28$, 95% $CI=0.90-1.80$). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day = 0.70, $df = 1$, $P = 0.39$; Cochran's $Q = 0.70$, $df = 1$, $P = 0.39$).

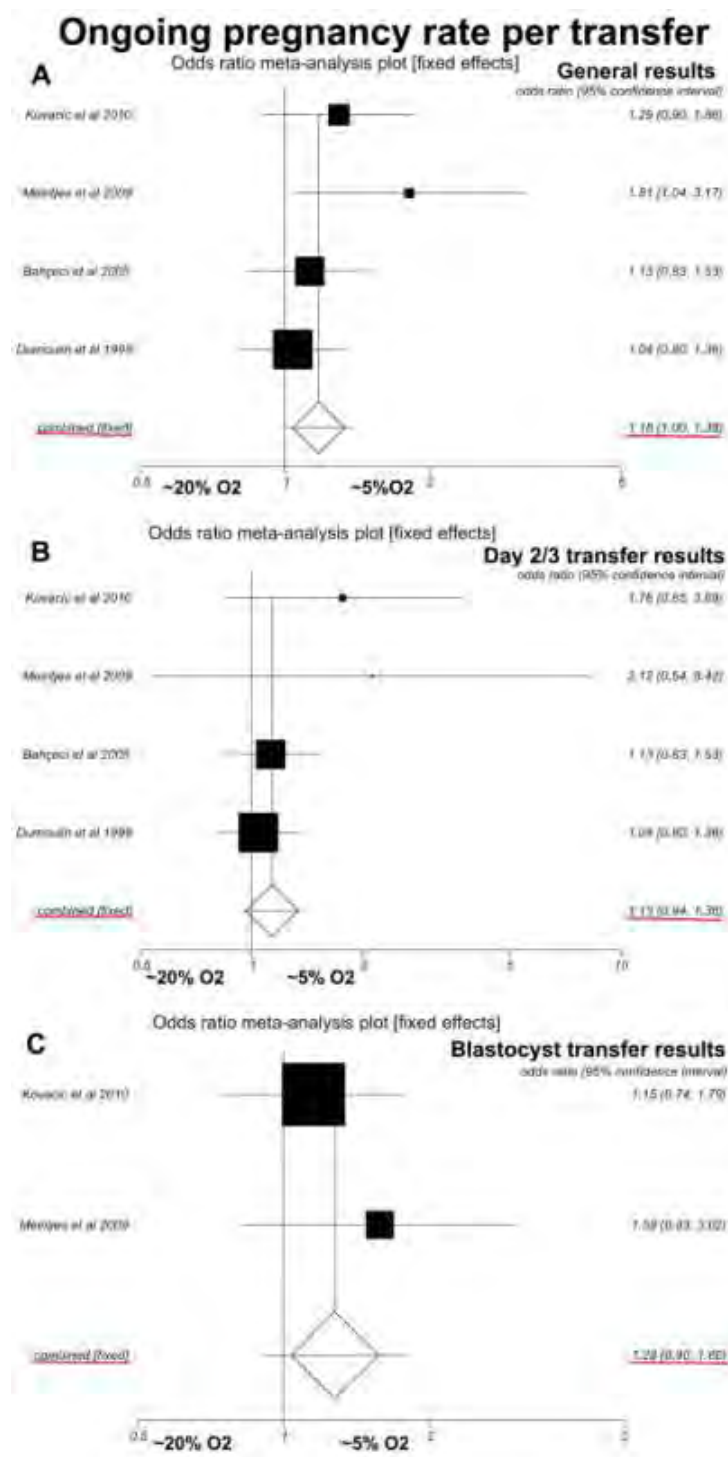


Figure 4. Fixed-effect model. Ongoing pregnancy rates. A: All cycles; B: Only cycles in which embryos were transferred on day 2 or 3; C: Only cycles in which embryos were transferred at the blastocyst stage.

Discussion

A review of the medical literature was directly motivated by the need to absorb the increasing volume of published information. Meta-analysis seeks to answer a certain clinical question using a well-defined strategy to locate relevant evidence, assess the available studies using clear methodological criteria and formally summarise the results. This method consists of an analytical approach in which different, independent studies are integrated and the results combined into a single common result. Compared with narrative reviews, meta-analysis has the great advantage of being less influenced by a reviewer's personal opinion, thus providing impartial conclusions. Additionally, all the results can easily be recalculated and compared with the conclusions stated by the authors. Even when it does not produce definitive conclusions about the usefulness of a treatment or technique, a meta-analysis may indicate the need for further randomised studies on the subject. Furthermore, previous meta-analyses allow the identification of the most important issues to be analysed in future research studies. Based on positive results in animals, several RCTs evaluating the effects of gamete and embryo cultures at low O₂ concentrations (~ 5%) on clinical outcomes have been published, especially recently [25, 28-30, 32 - 34]; however, the conclusions of these studies have not always been consistent. Therefore, given the clinical potential of this method, a review of this subject was deemed useful.

As demonstrated in various animal models, laboratory results may not reflect the true capacity of embryos [35]. Therefore, it has been suggested that a meta-analysis should be patient oriented, i.e., the primary outcomes should be clinical results, which can be useful in predicting a better outcome and/or a more advantageous cost/effectiveness ratio. In this meta-analysis, embryonic culture at physiological O₂ concentrations displayed favourable effects not only on the implantation rate for the subgroup of cycles in which the transfer was performed at the blastocyst stage, but also there was trend for better results with ~5% O₂

concentration. Similar positive results excluded from this meta-analysis (e.g., data reported by only one study or data presented in a way that made the calculations impossible) have been reported by some RCTs (i.e., increases in biochemical [31, 33] and cumulative [32] pregnancy rates and higher rates of live births [25]). In addition, other non-randomised studies have also reported increased implantation [21] and pregnancy [21, 36, 37] rates. On the basis of these data, it may seem attractive to consider low O₂ tension as a means to improve clinical outcomes.

However, the majority of results obtained in this meta-analysis do not support this approach. Despite the apparent positive trend with low O₂ levels, the results showed similar rates of fertilisation, implantation (generally and in the subgroup with transfer at day 2 or 3), and ongoing pregnancy. Hence, despite some positive results, it seems premature to recommend the use of low O₂ tension for oocyte and embryo culture. To achieve a low oxygen concentration, an incubator should have sensors for both CO₂ and O₂; however, the commonly used units only have sensors for CO₂. In addition, nitrogen is initially used to purge O₂ from the incubator. Thus, the cost of supplying these three gases is greater than that for a typical incubator because each time the incubator is handled (i.e., when the door is opened), the interior atmosphere must be re-equilibrated with a further injection of nitrogen or a balanced mixture of gases to maintain a low O₂ concentration [38]. One option would be exchanging the typical large incubators for low-volume units (e.g., benchtop incubators) that use continuous gas flow [39, 40]. In either case, the decision to use low O₂ concentrations implies, necessarily, changes in laboratory practices, with important economic repercussions. Therefore, we believe that additional randomised controlled trials are still necessary before evidence-based recommendations can be provided.

Meta-analysis also presents problems such as the quality of the primary studies or the form in which data are reported and the dependence on a sufficient number of eligible studies to justify the statistical analysis. Methodological problems caused by clinical heterogeneity and insufficient power (low sample size) make it difficult to draw inferences from the meta-analysis. In this study, heterogeneity was found only for the general implantation rate, maybe related to the fact that the calculations were carried out with the results of transfer of embryos in cleavaged stage and in blastocyst stage together. No heterogeneity was found for the other outcomes. This reflects the relative agreement among the trials regarding the studied parameters and has particular importance when statistically significant outcomes were found. Nevertheless, it should be stressed that tests of heterogeneity among studies have low power. Therefore, where there is a non-significant test for heterogeneity among studies, it may be that a relationship is present but remains undetected.

This meta-analysis failed to show any statistically significant differences in the most clinical outcome: the ongoing pregnancy rate. This observation may be related to the small cumulative sample size (i.e., insufficient power). With respect to the ongoing pregnancy rates, based on the results obtained with OC~5 and OC~20 embryo sets in the general population (34.6%, 31.6% and 484/1,398, 450/1,423, respectively), the subgroup with transfers at day 2 or 3 (31.1%, 29.2% and 349/1,121, 338/1,159) and the subgroup with transfers at the blastocyst stage (48.7%, 135/277 and 42.4%, 112/264), the ability to detect a difference of 5% with a power of 80% would require approximately 4000, >4,000 and 2,000 patients, respectively, to reach definitive conclusions. Thus, for more consistent conclusions, this meta-analysis suggests that researchers should wait for the results of new RCTs that provide more information on clinical parameters. In addition, although smaller studies conducted on diverse populations may better reflect the natural heterogeneity of treatment

effectiveness as found in daily practice, large studies may produce a more precise answer. Thus, further large-sample-size RCTs will be helpful for the corroboration of these results.

In many animal studies, the favourable effect of low oxygen concentrations was detected only in the late stages of embryonic (the blastocyst stage) or even in fetal development [6, 8-10, 12, 15, 16, 35, 41-44]. The continuous increase in the levels of ROS such as superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical HO in culture, which is directly proportional to the O_2 tension, is one hypothesis explaining these observations [20, 26, 31]. For this reason, the necessity of reducing oxygen levels has been associated only with blastocyst culture. In fact, more recent studies evaluating the transfer of human blastocysts have reported significantly better results with the use of low concentrations of oxygen (increased embryo quality [25, 28, 30, 31] and higher implantation [25], pregnancy and live birth [25, 31] rates). Unfortunately differences in embryonic evaluation criteria and in the method of presenting the data among the studies precluded the assessment of embryo quality in this meta-analysis. Although this meta-analysis identified higher implantation rates in the group of embryos cultured at ~5% O_2 than those grown at atmospheric O_2 levels, with respect to blastocyst transfer, it failed to identify any difference in the rates of ongoing pregnancies. Thus, despite the studies suggesting a direct action on the results, clinically relevant beneficial effects of low O_2 concentration were not confirmed. However, it is important to note that we cannot rule out that these negative results may be related to the small number of studies that met the inclusion criteria (only 2), leading to a cumulative sample size insufficient to detect a statistical difference. Again, future controlled trials will help to clarify this issue.

Considering that the likely harmful effects of atmospheric oxygen levels are mainly associated with the blastocyst stage, if they occur, it would thus be acceptable to use ~20%

oxygen in embryo cultures until day 2 or 3 [39]. However, it has been argued that deleterious effects of high oxygen levels can have an effect on embryos during the early developmental stages, despite the later onset of symptoms that occur during or subsequent to the blastocyst stage, which may affect clinical outcomes [6, 25, 35, 39]. Recently, Nannasy et al. [45] reported that human embryos cultured at ~20% oxygen concentration for days 1–2 and subsequently at 5% oxygen for days 3–5 did not display better implantation, pregnancy, or blastulation rates. The authors speculated that, among the possible explanations, embryos cultured in low oxygen on days 3–5 may not be able to overcome defects induced during days 1–2 of culture in atmospheric oxygen. Nonetheless, human studies examining O₂ tensions throughout the culture period and performing embryo transfers at day 2 or 3 [21, 25, 29, 32, 34] did not identify, in most cases, beneficial clinical outcomes associated with reduced oxygen levels, and these data were confirmed by the calculations of this meta-analysis. Future controlled trials will help to clarify this issue and should include results from later clinical stages, such as live birth rate, in the analysis.

In conclusion, the findings of this meta-analysis demonstrate that, despite some promising results, it seems premature to recommend the use of low O₂ tension for oocyte and embryo culture. Additional randomised controlled trials are still necessary before evidence-based recommendations can be provided.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Authors' Contributions

DBGS designed and coordinated the study. All authors were responsible for the data collection, analysis, and interpretation presented in the manuscript. DBGS, JBAO, RLRB and JGF performed the statistical analyses and wrote the manuscript; JGF reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors wish to thank the American Journal Experts (<http://www.journalexperts.com>) for revising the English text.

References

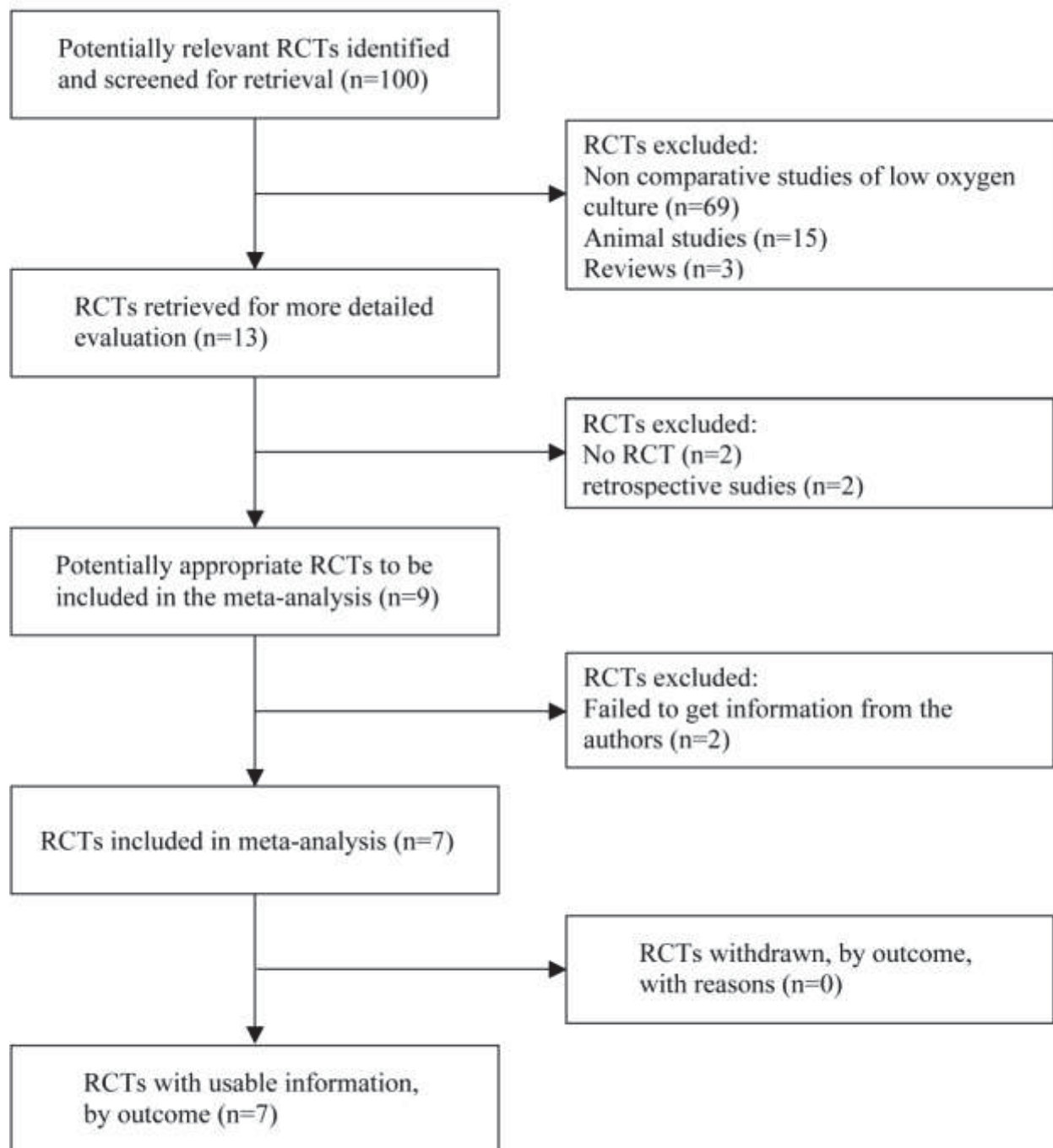
1. Fischer B, Bavister BD: **Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits.** *J Reprod Fertil* 1993, **99**:673-679.
2. Maas DH, Storey BT, Mastroianni L, Jr.: **Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*).** *Fertil Steril* 1976, **27**:1312-1317.
3. Mastroianni L, Jr., Jones R: **Oxygen Tension within the Rabbit Fallopian Tube.** *J Reprod Fertil* 1965, **9**:99-102.
4. Mitchell JA, Yochim JM: **Measurement of intrauterine oxygen tension in the rat and its regulation by ovarian steroid hormones.** *Endocrinology* 1968, **83**:691-700.
5. Kaufman DL, Mitchell JA: **Intrauterine oxygen tension during the oestrous cycle in the hamster: patterns of change.** *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 1994, **107**:673-678.
6. Pabon JE, Jr., Findley WE, Gibbons WE: **The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development.** *Fertil Steril* 1989, **51**:896-900.
7. Rinaudo PF, Giritharan G, Talbi S, Dobson AT, Schultz RM: **Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos.** *Fertil Steril* 2006, **86**:1252-1265, 1265 e1251-1236.
8. Quinn P, Harlow GM: **The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro.** *J Exp Zool* 1978, **206**:73-80.
9. Harlow GM, Quinn P: **Foetal and placental growth in the mouse after pre-implantation development in vitro under oxygen concentrations of 5 and 20%.** *Aust J Biol Sci* 1979, **32**:363-369.
10. Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T: **Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos.** *Mol Reprod Dev* 1992, **31**:28-33.
11. Kishi J, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T: **Block to development in cultured rat 1-cell embryos is overcome using medium HECM-1.** *Hum Reprod* 1991, **6**:1445-1448.

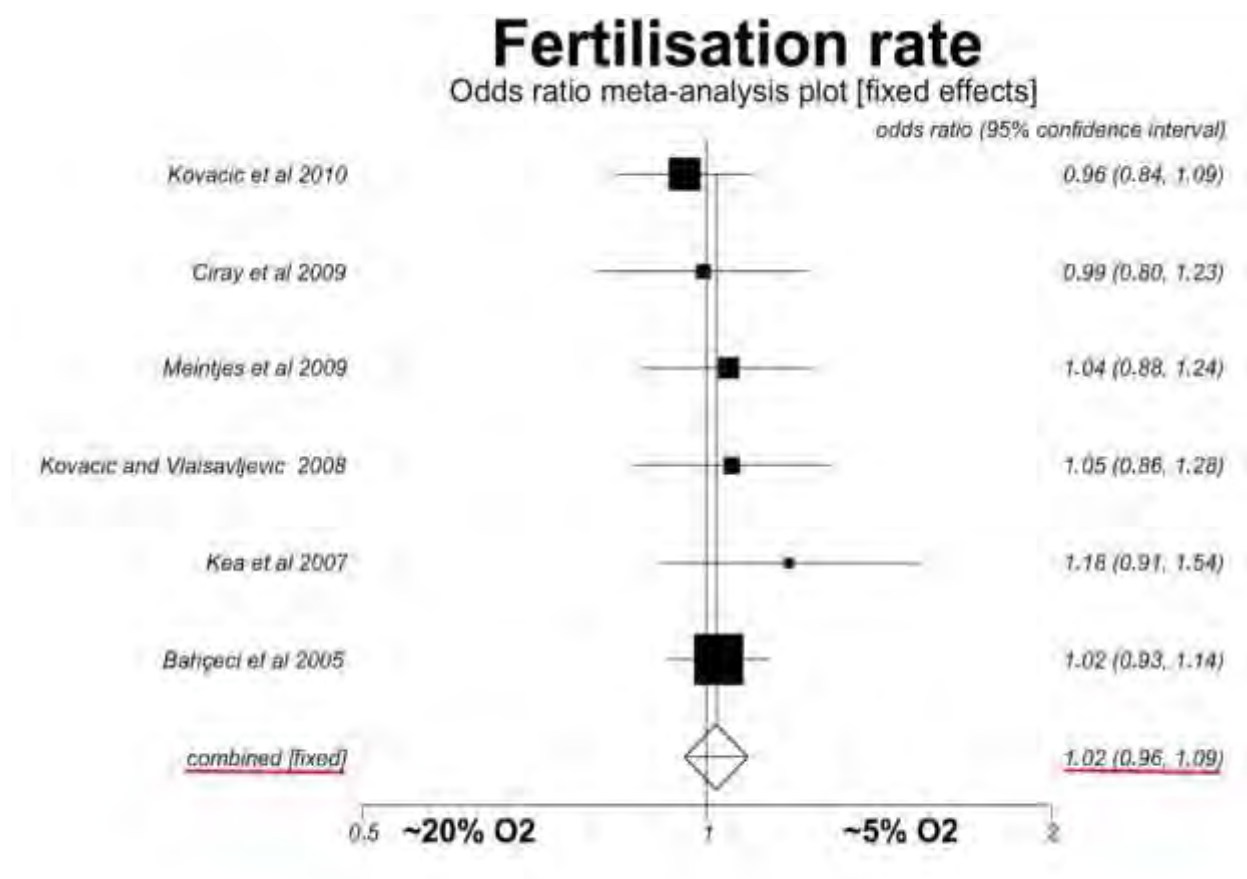
12. McKiernan SH, Bavister BD: **Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage.** *Biol Reprod* 1990, **43**:404-413.
13. Li J, Foote RH: **Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen.** *J Reprod Fertil* 1993, **98**:163-167.
14. Karja NW, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T: **Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine in vitro fertilized embryos.** *Theriogenology* 2004, **62**:1585-1595.
15. Batt PA, Gardner DK, Cameron AW: **Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro.** *Reprod Fertil Dev* 1991, **3**:601-607.
16. Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR: **Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos.** *J Reprod Fertil* 1990, **89**:573-578.
17. Leoni GG, Rosati I, Succu S, Bogliolo L, Bebbere D, Berlinguer F, Ledda S, Naitana S: **A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of in vitro produced ovine blastocysts.** *Reprod Domest Anim* 2007, **42**:299-304.
18. Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FO, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman LJ: **Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro.** *Theriogenology* 2003, **59**:1585-1596.
19. Bean CJ, Hassold TJ, Judis L, Hunt PA: **Fertilization in vitro increases non-disjunction during early cleavage divisions in a mouse model system.** *Hum Reprod* 2002, **17**:2362-2367.
20. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y: **Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings.** *Hum Reprod Update* 2001, **7**:175-189.
21. Catt JW, Henman M: **Toxic effects of oxygen on human embryo development.** *Hum Reprod* 2000, **15 Suppl 2**:199-206.

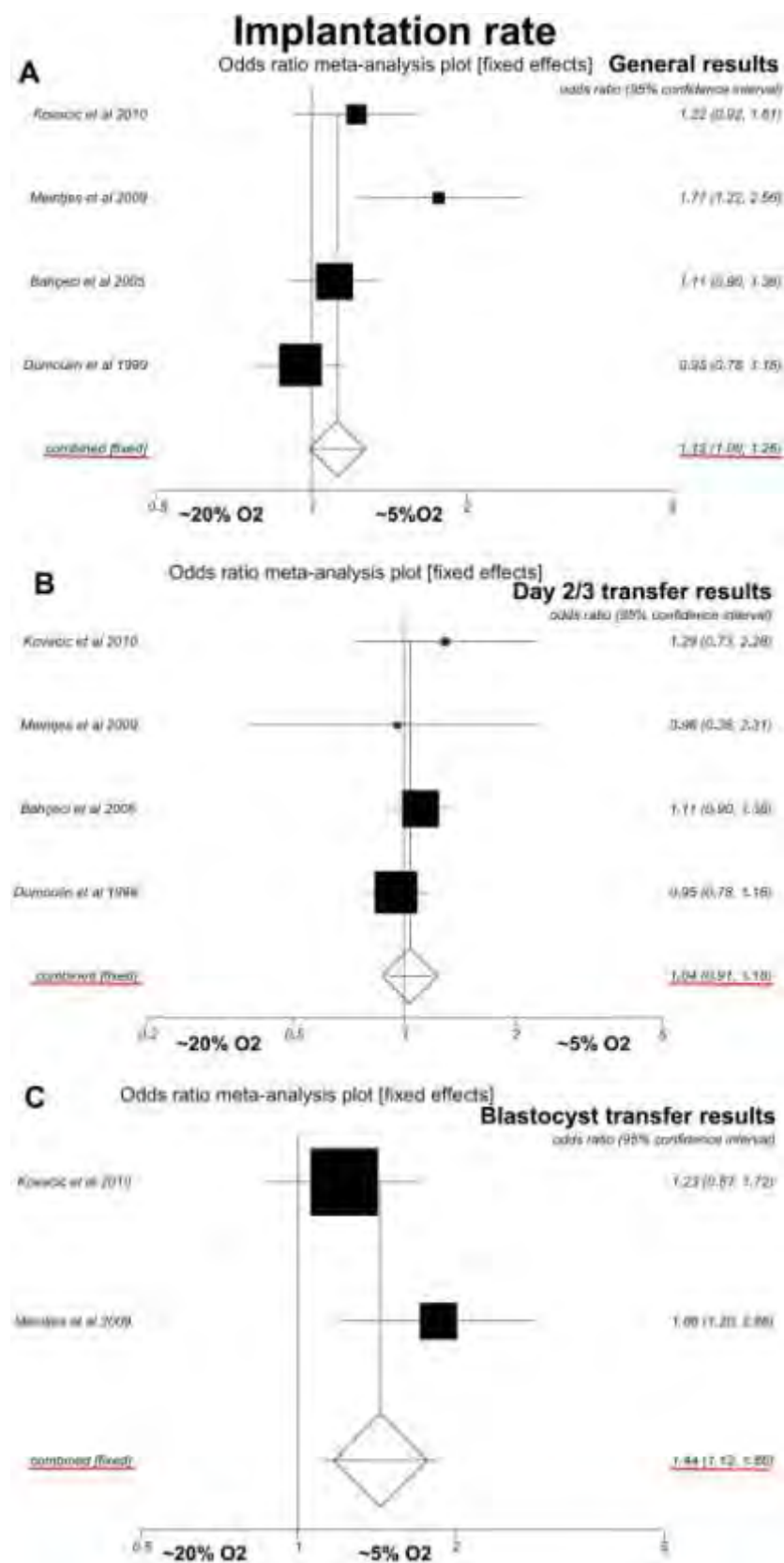
22. Kwon HC, Yang HW, Hwang KJ, Yoo JH, Kim MS, Lee CH, Ryu HS, Oh KS: **Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro.** *J Obstet Gynaecol Res* 1999, **25**:359-366.
23. Iwata H, Minami N, Imai H: **Postnatal weight of calves derived from in vitro matured and in vitro fertilized embryos developed under various oxygen concentrations.** *Reprod Fertil Dev* 2000, **12**:391-396.
24. Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG: **Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts.** *Biol Reprod* 2004, **71**:1108-1119.
25. 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.
26. Noda Y, Goto Y, Umaoka Y, Shiotani M, Nakayama T, Mori T: **Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination.** *Fertil Steril* 1994, **62**:1022-1027.
27. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS: **Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos.** *Hum Reprod* 1998, **13**:998-1002.
28. 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**:229-236.
29. 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**:465-469.
30. Ciray HN, Aksoy T, Yaramanci K, Karayaka I, Bahceci M: **In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes.** *Fertil Steril* 2009, **91**:1459-1461.

31. Waldenstrom U, Engstrom AB, Hellberg D, Nilsson S: **Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study.** *Fertil Steril* 2009, **91**:2461-2465.
32. 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.
33. Kea B, Gebhardt J, Watt J, Westphal LM, Lathi RB, Milki AA, Behr B: **Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of in vitro fertilization.** *Fertil Steril* 2007, **87**:213-216.
34. Bahceci M, Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F: **Effect of oxygen concentration during the incubation of embryos of women undergoing ICSI and embryo transfer: a prospective randomized study.** *Reprod Biomed Online* 2005, **11**:438-443.
35. Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U, Bahceci M: **Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes.** *Reprod Biomed Online* 2004, **9**:409-417.
36. Kim SB, Kwon H, Kim EK, Kim JM, Choi DH, Cha KY: **The Comparison of Embryo Developments and Pregnancy Rates in Human in Vitro Culture Conditions at Different Oxygen Gas Phase.** *Fertil Steril* 2005, **84**:S16.
37. Madaschi C, Guilherme P, Izzo CPM, Yamakami LY, Fassolas G, Izzo CR: **Evaluation the effect of lowered incubator oxygen tension of embryo quality.** *Fertil Steril* 2010, **94**:S247.
38. Bavister BD, Poole KA: **Duration and temperature of culture medium equilibration affect frequency of blastocyst development.** *Reprod Biomed Online* 2005, **10**:124-129.
39. Bavister B: **Oxygen concentration and preimplantation development.** *Reprod Biomed Online* 2004, **9**:484-486.
40. Cooke S, Tyler JP, Driscoll G: **Objective assessments of temperature maintenance using in vitro culture techniques.** *J Assist Reprod Genet* 2002, **19**:368-375.

41. Adam AA, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M: **Effects of oxygen tension in the gas atmosphere during in vitro maturation, in vitro fertilization and in vitro culture on the efficiency of in vitro production of mouse embryos.** *Jpn J Vet Res* 2004, **52**:77-84.
42. Booth PJ, Holm P, Callesen H: **The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type.** *Theriogenology* 2005, **63**:2040-2052.
43. Rizos D, Ward F, Boland MP, Lonergan P: **Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification.** *Theriogenology* 2001, **56**:1-16.
44. Trokoudes KM, Minbattiwalla MB, Kalogirou L, Pantelides K, Mitsingas P, Sokratous A, Chrysanthou A, Fasouliotis SJ: **Controlled natural cycle IVF with antagonist use and blastocyst transfer.** *Reprod Biomed Online* 2005, **11**:685-689.
45. Nanassy L, Peterson CA, Wilcox AL, Peterson CM, Hammoud A, Carrell DT: **Comparison of 5% and ambient oxygen during days 3-5 of in vitro culture of human embryos.** *Fertil Steril* 2010, **93**:579-585.







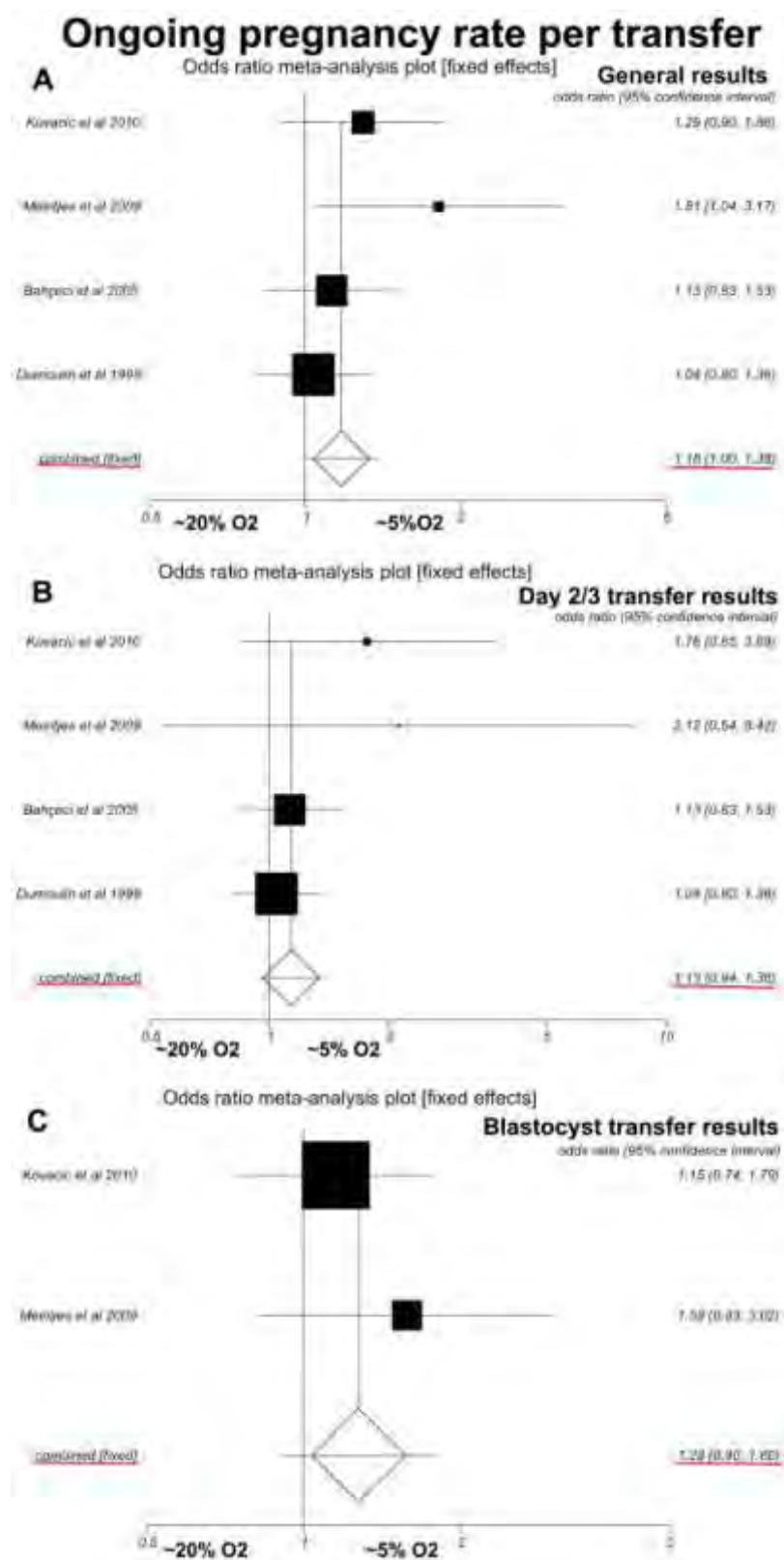


Table 1. Main characteristics of the randomised controlled trials (RCT) on human embryo development at low oxygen tension.

Trial	Objective	Randomisation	Protocol stimulation	Culture O ₂ tension		Procedure	Embryo transfer	Results
				Study group	Control group			
Dumoulin et al. 1999 [29]	To compare the results of human IVF and embryo culture under 5% O ₂ and under atmospheric O ₂ concentrations	Alternately allocated per set of two treatment cycles	Long GnRH agonist (nafarelin) protocol	n: 400 patients 5% O ₂ , 5% CO ₂ , 90% N ₂	n: 402 patients ~20% O ₂ , 5% CO ₂	IVF/ICSI	Day 2/3	No beneficial effect on fertilisation, embryonic development and pregnancy rates Slight but significant improvement of development to the blastocyst stage found when 5% O ₂ was used.
Bahçeci et al. 2005 [34]	To examine if ICSI outcome, in terms of pregnancy and implantation rates, would be altered by culturing human embryos under 5% O ₂ for the first 2–3 days	According to the day of admission to the embryology laboratory (calendar day; even or odd)	Long GnRH agonist (leuprolide) or GnRH antagonist (cetorelix) protocols	n: 337 patients 5%O ₂ , 6% CO ₂ , 89% N ₂	n: 375 patients 20%O ₂ , 6% CO ₂	ICSI	Day 2/3	Did not alter the clinical outcome
Kea et al. 2007 [33]	To examine the effect of O ₂ concentration during the first 3 days of embryo culture	By week of oocyte retrieval	Not mentioned	n:49 patients 5% O ₂ , 5%CO ₂ , and 90% N ₂	n: 57 patients 20% O ₂ , 5% CO ₂	IVF/ICSI	Day 3 or 5	No significant effects on fertilisation rate, blastocyst formation, or pregnancy rate, Better embryo score on day 3 when 5% O ₂ was used.
Kovacic & Vlaisavljevic 2008 [28]	To analyse the effect of 5% and 20% oxygen on the prolonged development of embryos, using sibling human oocytes	Alternation (similarly expanded cumulus/MII oocyte: one here, one there)	Long GnRH agonist (triptorelin or goserelin) protocol	n: 160 patients n: 952 oocytes 5% O ₂ , 6% CO ₂ and 89%N ₂	n: 160 patients n: 960 oocytes ~ 20% O ₂ , 6% CO ₂	IVF/ICSI	Day 5/6	A significantly higher proportion of optimal embryos on day 3, improvements in the blastulation rate and in the proportion of embryos reaching the stage of expanded blastocyst with normal inner cell mass on day 5 when 5% O ₂ was used
Ciray et al 2009 [30]	A sibling oocyte model was employed to test the hypothesis that physiologic oxygen concentration improved blastocyst yield and quality in human embryo culture.	According to the protocol obtained from the internet	Long GnRH agonist (leuprolide) or GnRH antagonist (cetorelix) protocols	n: ? patients n: 75 oocytes retrievals n:868oocytes 5% O ₂ , 6%CO ₂ , 89%N ₂	n: ? patients n: 75 oocytes retrievals n:869oocytes ~20%O ₂ , 6% CO ₂	ICSI	Day 5/6	Improvements in embryo quality on day 3, in total blastocyst yield and in day 5 embryo quality when 5% O ₂ was used
Meintjes et al., 2009 [25]	To evaluate the effect of lowered incubator O ₂ tension on live birth rates in a predominately Day 5 embryo transfer program	Method not mentioned	Not mentioned	n:115 patients 5% O ₂ , 5% CO ₂ , 90% N ₂	n:115 patients 21% O ₂ , 5% CO ₂	IVF/ICSI	Day 2/3 or Day 5	Embryos cultured in a 5% O ₂ resulted in higher rates of implantation and live birth
Kovacic et al 2010 [32]	To assess whether the embryo cultivation at different oxygen tensions had any effect on ICSI outcome	Minimisation method	Long GnRH agonist (triptorelin or goserelin) protocol	n: 326 patients 5% O ₂ , 6% CO ₂ and 89% N ₂	n: 321 patients ~ 20% O ₂ , 6% CO ₂	ICSI	Day 3 or 5	Low O ₂ improves the proportion of good day 2 embryos, the proportion of optimal blastocysts, and the cumulative pregnancy rate



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 31 de maio de 2011.

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DATA DA APROVAÇÃO: 25/05/2011

Protocolo nº: 019/11

TÍTULO DO ESTUDO: "Resultados de FIV/ICSI após o desenvolvimento do Embrião humano em baixa concentração de oxigênio: uma meta-análise".

NOME DO INVESTIGADOR PRINCIPAL: David Barreira Gomes Sobrinho.

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa, tendo sido a referida aprovação constado em ata.

Dr. Jorge Yoshinori Shida
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do CRSM