

Revisando os efeitos da concentração de oxigênio sobre o desenvolvimento embrionário

Reviewing the effects of oxygen tension on embryo development

David Barreira Gomes Sobrinho^{1,4,5}, João Batista Alcântara Oliveira^{1,2,3}, Bruno Ramalho de Carvalho⁴, José Gonçalves Franco Júnior^{1,2,3}

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

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

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

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

⁵ Endereço 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 embryo development and implantation of mammals do not occur in atmospheric tension *in vivo*, it is common practice in laboratories for *in vitro* fertilization (IVF) the culture of embryos in an oxygen tension of 20%. The discrepancy between the tensions of oxygen leads to important discussions about their effects *in vitro* embryo development. It is believed that the culture of embryo in atmospheric oxygen tension 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 embryo gene expression and blastocysts grown in those conditions. Faced with

arguments for and against the culture of embryos *in vitro* oxygen tensions similar to those found *in vivo*, this review article aims to condense and discuss the literature concerning the influence of oxygen tension on the quality of *in vitro* culture.

Keywords: low tension oxygen, 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 fluidos 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) e até mesmo espermatozoides 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 disulfeto 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 à 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 fluidos 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, glutatona-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 & Quinn, 1979; Pabon *et al*, 1989; McKier-

nan & 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 (Mastroianni & 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; Garris & 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 à 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*, 2009).

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 concorrer 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 & Vlasisavljevic, 2008; Ciray *et al*, 2009; Meintjes *et al*, 2009; Waldenström *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 & Vlasisavljevic, 2008; Ciray *et al*, 2009; Meintjes *et al*, 2009; Waldenström *et al*, 2009), com massa celular interna normal (Kovacic & Vlasisavljevic, 2008), aumento das

taxas de implantação (Meintjes *et al*, 2009), gravidez clínica e nascidos vivos (Meintjes *et al*, 2009; Waldenström *et al*, 2009).

Em um modelo de estudo com oócitos irmãos, Kovacic & Vlasisavljevic 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 espermatozoides (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. (Kovacic & Vlasisavljevic, 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 (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 mães respondedoras (Kovacic *et al*, 2010) ou mulheres com idade superior há 40 anos (García *et al*, 2010). Kovacic *et al* (2010) realizaram estudo com oócitos em ciclos de ICSI, dividido em três grupos de mulheres: (1) ótimas respondedoras; (2) mães 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 mães 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 resultante após esta estratificação (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 supra-fisiológicas 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 supra-fisiológicas 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 e tempo 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 utilizado mais comumente em laboratório de reprodução assistida nos dias de hoje.

REFERÊNCIAS

- Bahçeci M, Ciray HN, Karangenc 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 Fert 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, 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.
- 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 JH. 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, Ménézo 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.
- Kovacic 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.
- 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(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.