Biologia de la reproducció
Vol. 16, p. 79-84 (2019)

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO Y EL MEDIO DE CULTIVO EN EL DESARROLLO A BLASTOCISTO Y LA EXPRESIÓN DE OCT4

Salvadora Cívico[1*], Ester Vidal[1], Josep Mª Calafell[1], Vicenta Moreno[1], Marta Guimerà[1], Neus Agell[2]

[1] Unitat de Reproducció Assistida, Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona.

[2] Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona

* Autor de correspondencia: Salvadora Cívico- scivico@clinic.ub.es

Resumen

La capacidad para producir y cultivar embriones humanos in vitro depende de las condiciones físicas y químicas que proporciona el sistema de cultivo empleado. La composición del medio de cultivo y las condiciones ambientales repercuten en la embriogénesis, en el potencial de implantación de los embriones generados y pueden modificar la expresión génica. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la concentración de oxígeno (7% vs 21%) y el medio de cultivo (ISM1/BA o Global) en la tasa de desarrollo a blastocisto, la calidad de los blastocistos obtenidos y la expresión del marcador de totipotencia OCT4. Para ello, se emplearon 403 embriones criopreservados donados para investigación. Los embriones de cada paciente se distribuyeron al 50% entre las dos condiciones de oxígeno en uno u otro medio de cultivo. El contaje de células y el análisis de la expresión de OCT4 se realizó mediante técnicas de inmunocitoquímica y microscopía confocal. 253 embriones fueron cultivados en ISM1/BA (131 al 7% i 122 al 21%) y 150 en medio Global (80 al 7% i 70 al 21%). No se observaron diferencias significativas en las tasas de blastocisto, cultivando al 7 o al 21% de oxígeno con el medio ISM1/BA pero sí hubo diferencias significativas en el número de células de los blastocistos obtenidos (p=0.015). Por el contrario, la tasa de blastocisto cultivando al 7% en medio Global fue superior a la tasa obtenida cultivando al 21% (p=0.0026), pero no hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de células de los blastocistos obtenidos (p=0.057). En cuanto a la expresión de OCT4, no hubo diferencias significativas en los patrones de expresión del gen en los blastocistos obtenidos al 7% o el 21% utilizando el medio ISM1/BA. El bajo número de blastocistos obtenido con medios Global al 21% no permitió la comparación de los patrones de expresión de OCT4; no obstante, el porcentaje de blastocistos con un patrón de expresión normal para OCT4 obtenido con el medio Global, fue similar al obtenido con los medios ISM1/BA.

Palabras claves: LCR, NAHR, deleció, 22q11.2, espermatozoides.

Abstract

The capacity to produce and culture human embryos in vitro depends on the physical and chemical conditions provided by the culture system used. The composition of the culture medium and environmental conditions have an impact on embryogenesis, on the implantation potential of the generated embryos and can modify gene expression. The objective of this work was to analyze the effect of oxygen concentration (7% vs 21%) and culture medium (ISM1/ BA or Global) on the blastocyst development rate, the quality of the blastocysts obtained, and the expression of the totipotency marker OCT4. For this, 403 cryopreserved embryos donated for research were used. The embryos of each patient were distributed 50% between the two oxygen conditions in one or other culture medium. Cell counting and analysis of OCT4 expression was performed by using immunocytochemical techniques coupled with confocal microscopy. 253 embryos were cultured in ISM1/BA medium (131 to 7% and 122 to 21%) and 150 in Global medium (80 to 7% and 70 to 21%). No significant differences were observed either in the blastocyst rates or in the number of cells of the obtained blastocysts, culturing at 7 or 21% oxygen with ISM1/BA medium. On the contrary, the blastocyst rate culturing at 7% oxygen in Global Medium was higher than the rate obtained culturing at 21% (p = 0.0026). There were no statistically significant differences in the number of cells of the obtained blastocysts using either 7% or 21% oxygen in the Global medium (p = 0.057). There were no statistically significant differences in the expression patterns of OCT4 in one or another oxygen condition in either of the two culture media analyzed.

Key words: Culture conditions, culture medium, blastocyst, oxygen, gene expression, OCT4.

INTRODUCCIÓN

La capacidad para producir y cultivar embriones humanos in vitro depende de las condiciones físicas y químicas que proporciona el sistema de cultivo empleado. La composición del medio de cultivo y las condiciones ambientales en las que utilizamos ese medio (temperatura, pH, porcentaje de CO2 y O2, plásticos, concentración de volátiles en el aire, etc..), han de permitir la expresión del potencial genético de los embriones. Las condiciones de cultivo in vitro repercuten en la embriogénesis y en el potencial de implantación de los embriones generados, pueden modificar la expresión génica, el metabolismo o el imprinting del embrión y pueden tener efectos sobre el desarrollo prenatal y postnatal (Guerin & Menezo, 2011).

Todos los medios de cultivo empleados en FIV contienen iones, substratos que proporcionan energía como la glucosa, el piruvato, el lactato o la glutamina; pueden contener aminoácidos "esenciales" y "no esenciales", vitaminas, ácidos grasos, precursores de los ácidos grasos y de los ácidos nucleicos, hormonas, y, dependiendo del substrato energético, y de la concentración empleada, supresores de la glucólisis como el ácido etilendiamintetracético (EDTA), y antibióticos como la penicilina, la estreptomicina o la gentamicina (Thomas B Pool, 2005). Los medios de cultivo empleados pueden ser secuenciales o puede utilizarse un medio único que contenga todos los metabolitos que el embrión necesita. Los medios de cultivo se suplementan con suero como fuente de proteínas, y fundamentalmente de albúmina. No se conoce a fondo cual es el papel de la albúmina en el medio de cultivo; se sabe que se une a diferentes moléculas como lípidos, aminoácidos, péptidos, catecolaminas, y que puede ser incorporada por el embrión y actuar como molécula transportadora de nutrientes. Por otra parte, se sabe que el suero desestabiliza el medio de cultivo al contener enzimas, metabolitos, y catabolitos y que, puede incrementar el riesgo de que aparezcan patologías relacionadas con el imprinting (Rinaudo & Schultz, 2004).

Las condiciones de cultivo in vitro difieren sustancialmente de las condiciones in vivo en términos de luz, pH, pCO_2/O_2, temperatura, movimiento, interacción con el oviducto, etc… La concentración de CO2 empleada en FIV es del 5-7% y la concentración de oxígeno puede ir del 5-8% al 21% (concentración del oxígeno en el aire). Se desconoce el efecto que tiene la concentración de oxígeno sobre el embrión humano, aunque diferentes estudios avalan la hipótesis de que las elevadas concentraciones de oxígeno empleadas en FIV contribuyen de una forma incuestionable a la generación de especies reactivas de oxígeno (Agarwal et al., 2003; Bedaiwy et al., 2004) y al desarrollo subóptimo de los embriones (Goto et al., 1993) y repercuten negativamente en la expresión génica de los blastocistos obtenidos, en su perfil proteico (proteoma) y en el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos (revisado en (David K Gardner & Wale, 2013). Por otro lado, numerosos trabajos de la especialidad avalan que el cultivo con bajas concentraciones de oxígeno mejoran los resultados en FIV (Bontekoe et al., 2012), las tasas de desarrollo embrionario hasta blastocisto (Gomes Sobrinho et al., 2011) y las tasas de "niño en casa" (Bontekoe et al., 2012). En este sentido, es importante destacar, lo apuntado por diversos autores: que el efecto de la concentración de oxígeno en el desarrollo embrionario va a depender de la composición del medio de cultivo empleado (Catt & Henman, 2000).

En este contexto, y con el objetivo de analizar el efecto de la concentración de oxígeno en el desarrollo embrionario y la expresión génica, planteamos un estudio en el que empleamos dos medios de cultivo comercializados (uno secuencial y otro único), en dos condiciones diferentes de cultivo: baja (7%) o alta concentración de oxígeno (21%). El efecto de la concentración de oxígeno sobre el desarrollo de los embriones se evaluó analizando la tasa de blastocisto y cuantificando el número de células del blastocisto. El efecto de la concentración de oxígeno sobre la expresión génica, se valoró analizando la expresión del factor de transcripción OCT4 (octamer-binding transcription factor 4) que sólo expresan las células pluripotentes de la masa celular interna. Se cree que OCT4 es uno de los factores decisivos en el mantenimiento de la totipotencia de las células germinales y embrionarias. En humanos, OCT4 está presente en las células germinales, en todos los estadios de desarrollo del embrión preimplantatorio, desde el ovocito al blastocisto y en las células madre embrionarias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los embriones procedentes de un mismo ciclo de FIV se cultivaron en el medio de cultivo correspondiente (secuencial o único) repartiéndose al 50% en las siguientes condiciones de cultivo: 7% O_2, 6.5%CO_2 **y 37ºC ó** 21% O_2, 6.5%CO_2 **y 37ºC.** En todos los casos los embriones fueron criopreservados en estadio de pronúcleos o células (4-8 células), descongelados y cultivados durante 2-4 días. Los embriones empleados en este estudio fueron donados para investigación siguiendo el procedimiento descrito en la ley de 14/2006 de Reproducción Humana Asistida.

ESTUDIO 1: características pacientes y medios

En el primer estudio (medio secuencial, ISM1/BA) se incluyeron 44 pacientes, se descongelaron 303 embrio-

nes y se cultivaron 253. La edad media de las pacientes fue de 32 años (media ± DS = 32.85 ± 3.725) y el 95.12% de ellas resultaron gestantes en el ciclo de FIV en fresco, siendo el 69.23% de las gestaciones gemelares y el 25.64% gestaciones únicas. Los embriones se cultivaron en medio de cultivo ISM1 entre el D+1 y D+3, y en BA a partir del D+3. Los medios ISM1 y BA contienen albúmina sérica humana (HSA, <1%) como suplemento proteico. El medio BA además de HSA, contiene SSR (Synthetic Serum Replacement, >0.01%).

ESTUDIO 2: características pacientes y medios

En el segundo estudio (medio único, Global) se descongelaron 163 embriones y se cultivaron 150 correspondientes a 23 pacientes de FIV. La edad media de las pacientes incluidas en el estudio fue de 33 años (media ± DS = 33.71 ± 3.22) y el 73.92% de las pacientes resultaron gestantes en el ciclo de FIV. El 58.82% de las gestaciones fueron únicas y el 41.17% gemelares. El medio de cultivo empleado se caracteriza por contener todos los compuestos necesarios para soportar el desarrollo del embrión desde el D+1 hasta el D+5. El medio Global tiene como suplemento proteico HSA (4.4 mg/ml) y α y β globulinas (0.6 mg/ml).

Tasa de blastocisto y blastocisto viable

El efecto de la concentración de oxígeno se valoró en base al número de blastocistos formados en D+5 respecto al total de embriones cultivados (tasa de blastocisto) y al número de blastocistos viables: blastocistos con masa celular interna y trofectodermo definidos. La tasa de blastocistos viables es el número de blastocistos viables respecto al total de embriones cultivados.

Contaje de células y expresión de OCT4

Los blastocistos catalogados como viables fueron fijados para inmunocitoquímica y análisis mediante microscopía confocal con el fin de estudiar la expresión de OCT4 en cada condición y cuantificar de forma diferencial las células que formaban parte de la masa celular interna (mci) y las células del trofectodermo (TE). Tras ser fijados y permeabilizados, los embriones fueron incubados con un anticuerpo anti-OCT4 a 4ºC overnight (dil 1:10) y posteriormente con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 555, (dil 1:50) durante 1 hora a 37ºC. Para marcar y contar los núcleos de los blastocistos, los embriones fueron incubados en una solución de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), durante una hora a 37ºC. Para la adquisición de las imágenes se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP5 Confocal Laser Scanning Microscope (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Manheim, Germany) equipado con un microscópio invertido DMI6000. Para el contaje de células de la mci y el TE se analizó cada uno de los planos focales adquiridos con la ayuda del plugin Analyze - "Cell Count " de ImageJ. Las células pertenecientes al TE (o a la mci) que no expresan OCT4 aparecen marcadas en azul y las células que expresan OCT4 aparecen marcadas en color rosa fucsia, suma de la emisión de luz azul del DAPI y el rojo del Alexa 555.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran las tasas de desarrollo a blastocisto obtenidas con el medio secuencial (ISM1/BA) o el medio único (Global) en función de la concentración de oxígeno empleada.

Cuando se empleó el medio secuencial ISM1/BA, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ni en la tasas de blastocisto (p= 0.6693) ni en la tasas de blastocisto viable (p= 0.4010) al cultivar al 7% o el 21% de oxígeno. Las diferencias obtenidas en las tasas de blastocistos empleando el medio único Global, sí fueron estadísticamente significativas, siendo el valor de p= 0.0026. También resultaron significativas las diferencias entre las tasas de blastocistos viables (p= 0.0087). La tasa de blastocisto cultivando al 7% con medio Global fue estadísticamente superior a la tasa

Tabla 1. Tasa de blastocisto en función del medio de cultivo y la concentración de oxígeno.

	Medio secuencial (ISM1/BA)		Medio único (Global)	
	$[O_2]$= 7%	**$[O_2]$= 21%**	**$[O_2]$= 7%**	**$[O_2]$= 21%**
Pacientes	44	44	23	23
Nº embriones cultivados	131	122	80	70
Nº blastocistos obtenidos	55	48	47	23
Tasa de blastocisto	**41.98%**	39.34%	**58.75%**	32.86%
Nº blastocistos viables	47	38	37	17
Tasa de blastocistos viables	35.87%	31.14%	46.25%	24.29%

conseguida con medios ISM1/BA con la misma concentración de oxígeno (p=0.018). Los resultados se analizaron mediante el test estadístico Ji-cuadrado.

En la tabla 2 se muestran los resultados del contaje del número de células de los blastocistos obtenidos. Cuando se emplearon los medios ISM1/BA, la comparación estadística entre los valores obtenidos para el número de células de la m.c.i. cultivando al 7 o el 21% de oxígeno no presentó diferencias significativas (p=0.116). Tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar el número de células del TE (p=0.054). Sí se encontraron diferencias significativas al comparar el número total de células de los blastocistos obtenidos (p= 0. 015). Al cultivar con el medio único (Global) no se encontraron diferencias significativas ni en el número de células de la m.c.i. (p=0.08), ni en el número de células del TE (p=0.186), ni en el número total de células de los blastocistos obtenidos (p= 0.057). Los resultados fueron analizados comparando las medias en cada grupo con el paquete estadístico SPSS, versión 11 (SPSS, Chicago, IL,USA). La prueba empleada fue la t de Student para muestras independientes y el nivel de significancia estadística se estableció en 0.05 para todos los análisis (error 5%).

Patrón 4 (P4): agrupa a todos aquellos blastocistos que no presentaban MCI definida pero expresaban OCT4 en todas o en parte de las células del blastocisto.

Dado el bajo número de blastocistos viables disponibles en el grupo del 21% de oxígeno con medios Global, no se analizaron estadísticamente las diferencias en los patrones de expresión encontrados para OCT4. Es de destacar que, de los embriones cultivados al 7% con medios Global, el 45.75% presentaron un patrón tipo 1, con masa celular y TE bien definidos y el 15.58% presentaban un patrón tipo 2, con expresión de OCT4 tanto en la mci como en el TE. El 38.67% no presentaban mci definida y pertenecían a los patrones 3 y 4. Este porcentaje de embriones sin mci fue superior al que se obtuvo con los medios Origio y 7% de oxígeno (27.66%).

Los resultados de OCT4 para los medios ISM1/BA se muestran en la tabla 3. No hubo diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los patrones definidos. Patrón 1: p=0.4326, Patrón 2: p= 0.7237, Patrón 3: p=0.8193, Patrón 4: p= 0.1121). Los resultados se analizaron mediante el test estadístico Ji-cuadrado.

Tabla 2. Número de células de los blastocistos obtenidos en función del medio de cultivo y la condición de oxígeno empleados.

	Medio secuencial (ISM1/BA)		Medio único (Global)	
	$[O_2]$= 7%	**$[O_2]$= 21%**	**$[O_2]$= 7%**	**$[O_2]$= 21%**
Nº blastocistos analizados	47	38	35	17
Nº blastocistos con mci y TE diferenciados*	20 (42.55%)	13 (34.21%)	16 (45.71%)	7 (41.17%)
Nº células mci/ blastocisto	361/20 = 18.05	154/13 = 11.84	321/16= 20.06	28/7= 4
Nº células TE / blastocisto	1833/20 =91.65	799/13 = 61.46	1456/16= 91	483/7=69
Nº células total del blastocisto	2194/20=109.7	953/13= 73.31	1809/16=113.1	528/7= 75.4

* Sólo se consideran aquellos blastocistos en los que la expresión de OCT4 permitía contar con seguridad las células de la m.c.i. y el TE.

Los blastocistos analizados presentaron diferentes perfiles de expresión para OCT4. Para analizar estos datos con mayor facilidad, estos perfiles se agruparon en cuatro patrones diferentes en función de la ubicación del factor de transcripción dentro del blastocisto:

Patrón 1 (P1): agrupa a aquellos blastocistos que presentaban expresión del factor de transcripción OCT4 exclusivamente en la mci.

Patrón 2 (P2): corresponde a los blastocistos con expresión de OCT4 en la MCI y el TE.

Patrón 3 (P3): se asignó a aquellos embriones que no presentaban MCI definida y no expresaban OCT4.

Tabla 3. Expresión de OCT4 en los blastocistos obtenidos con medios ISM1/BA.

	$[O_2]$= 7%	**$[O_2]$= 21%**
Blastocistos	47	38
Patrón 1	20 (42.55%)	13 (34.21%)
Patrón 2	14 (29.79%)	10 (26.32%)
Patrón 3	7 (14.89%)	5 (13.16%)
Patrón 4	6 (12.77%)	10 (26.31%)

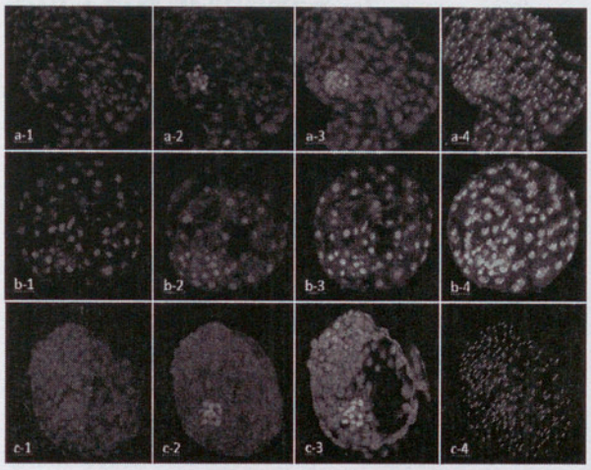

Figura 1. Patrones de expresión de OCT4. a) corresponde a P1, b) P2, c)P3, d-g) P4. El factor de transcripción OCT4 se marcó en rojo y el DNA del núcleo en azul.

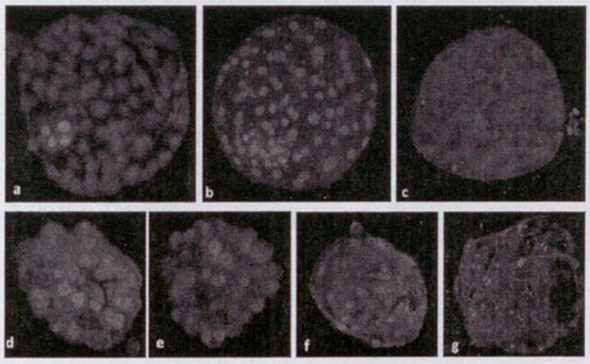

Figura 2. Contaje de células.

DISCUSIÓN

Muchos estudios han demostrado que el desarrollo de los embriones in vitro es más lento que el de los embriones que se desarrollan in vivo y que las condiciones de cultivo in vitro incluso pueden inducir el bloqueo de los embriones. Uno de los factores ambientales que podría contribuir más significativamente a esas diferencias en el desarrollo de los embriones es la elevada concentración de oxígeno empleada en los cultivos in vitro y la generación de especies reactivas del oxígeno que comporta cultivar en dichas condiciones. La adición a los medio de cultivo de antioxidantes o agentes reductores favorecen el crecimiento de los embriones hasta el estadio de blastocisto, lo que permite relacionar el estrés oxidativo y las especies reactivas del oxígeno con el desarrollo subóptimo de los embriones (revisado en (Takahashi M, 2012)).

En nuestro estudio, el efecto de una concentración de oxígeno más fisiológica sobre el desarrollo embrionario sólo pudimos apreciarla al cultivar los embriones con medios Global (LifeGlobal). El medio Global se caracteriza por contener además de HSA (4.4 mg/ml), α y β globulinas (0.6 mg/ml), que estimulan el desarrollo a blastocisto. Los medios de cultivo que contienen globulinas permiten obtener mayores tasas de blastocistos que los medios que contienen exclusivamente albúmina sérica humana como suplemento proteico (Marius Meintjes, 2012; Marius Meintjes, Chantilis, Ward, et al., 2009) y los blastocistos obtenidos tienen un número de células mayor (Tanikawa et al., 1999). El mecanismo de actuación específico de las globulinas es desconocido, pero podría estar relacionado con la capacidad de secuestrar del medio compuestos embriotóxicos como las especies reactivas del oxígeno y reducir la incidencia de apoptosis (Esfandiari et al., 2005).

Estos resultados demuestran que el efecto de la concentración de oxígeno en el desarrollo embrionario depende de la composición del medio de cultivo empleado, como ya apuntaron con anterioridad otros autores (Catt & Henman, 2000). Esto explicaría en parte los resultados contradictorios publicados respecto al cultivo con bajas o altas concentraciones de oxígeno.

El patrón de expresión de OCT4 fue similar en los blastocistos obtenidos cultivando al 7 o al 21% de oxígeno del primer estudio, apareciendo en ambos casos asociado mayoritaria y exclusivamente a la masa celular interna pero también, aunque en menor proporción, asociado a las células diferenciadas del trofectodermo, lo que indica que la expresión de OCT4 no está restringida a las células pluripotentes del embrión. La localización de OCT4 en el trofectodermo encontrada en los dos estudios realizados coincide con los datos publicados por otros autores y no se ha relacionado con la viabilidad de los blastocistos ni con ningún aspecto relevante del desarrollo (Cauffman, Van de Velde, Liebaers, & Van Steirteghem, 2005; Hansis, 2000).

BIBLIOGRAFÍA

Agarwal A, Saleh R a., Bedaiwy M a. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;**79**:829–843.

Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, Thornton J, Agarwal A. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril* 2004;**82**:593–600. Center for Advanced Research in Human Reproduction, Infertility, and Sexual Function, Cleveland Clinic Foundation, 9500 Euclid Avenue, Cleveland, OH 44195, USA.

Bontekoe S, Mantikou E, Wely M van, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane database Syst Rev* 2012;**7**:CD008950.

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

Cauffman G, Velde H Van de, Liebaers I, Steirteghem A Van. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Mol Hum Reprod* 2005;**11**:173–181.

Esfandiari N, Falcone T, Agarwal A, Attaran M, Nelson DR, Sharma RK. Protein supplementation and the incidence of apoptosis and oxidative stress in mouse embryos. *Obstet Gynecol* 2005;**105**:653–660.

Gardner DK, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril* 2013;**99**:1062–1072. Elsevier.

Gomes Sobrinho DB, Oliveira JBA, Petersen CG, Mauri AL, Silva LFI, Massaro FC, Baruffi RLR, Cavagna M, Franco JG. IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;**9**:143.

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.

Guerin P, Menezo Y. Review: role of tubal environment in preimplantation embryogenesis: application to co-culture assays. *Zygote* 2011;**19**:47–54. p.guerin@vet-lyon.fr.

Hansis C. Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2000;**6**:999–1004.

Meintjes M, Chantilis SJ, Ward DC, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, Barnett BD, Madden JD. A randomized controlled study of human serum albumin and serum substitute supplement as protein supplements for IVF culture and the effect on live birth rates. *Hum Reprod* 2009c;**24**:782–789.

Meintjes M. Media composition: macromolecules and embryo growth. *Methods Mol Biol* 2012;**912**:107–127.

Pool TB. An update on embryo culture for human assisted reproductive technology: media, performance, and safety. *Semin Reprod Med* 2005a;**23**:309–318.

Rinaudo P, Schultz RM. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. *Reproduction* 2004;**128**:301–311. Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA.

Takahashi M. Oxidative Stress and Redox Regulation on In Vitro Development of. 2012;**58**:1–9.

Tanikawa M, Harada T, Ito M, Yoshida S, Iwabe T, Terakawa N. Globulins in protein supplements promote the development of preimplantation embryos. *J Assist Reprod Genet* 1999;**16**:555–557.