

LUCIANA AZÔR DIB¹

MICHELE GOMES DA BROI¹

MARIA CRISTINA PICINATO MEDEIROS DE ARAÚJO²

ROBERTA CRISTINA GIORGENON²

RUI ALBERTO FERRIANI^{3,4}

PAULA ANDREA DE ALBUQUERQUE

SALES NAVARRO^{3,4}

Análise invasiva e não invasiva do fuso meiótico de oócitos humanos obtidos de ciclos estimulados: dados preliminares

Invasive and noninvasive analysis of the meiotic spindle of human oocytes obtained from stimulate cycles: preliminary results

XXXXXXXXXX

Palavras-chave

Oócito humano
Fuso
Microscopia de polarização
Microscopia confocal
Meiose
Fertilização *in vitro*

Keywords

Human oocyte
Spindle
Microscopy, polarization
Microscopy, confocal
Meiosis
Fertilization *in vitro*

Resumo

OBJETIVOS: Avaliar a concordância entre as técnicas de microscopia de polarização e microscopia confocal na avaliação do fuso meiótico de oócitos humanos maturados *in vivo*. **MÉTODOS:** Estudo prospectivo que avaliou oócitos com o primeiro corpúsculo polar extruído obtidos de mulheres inférteis submetidas à estimulação ovariana para realização de injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Os oócitos com o primeiro corpúsculo polar extruído foram avaliados por meio da microscopia de polarização e, imediatamente após, foram fixados e corados para avaliação dos microtúbulos e cromatina pela microscopia confocal de alto desempenho. Foram comparadas as técnicas de microscopia de polarização e confocal, de acordo com a visualização ou não do fuso meiótico pela microscopia de polarização e a presença ou não de anomalias meióticas à análise pela microscopia confocal. Foram calculados os intervalos de confiança, o índice de Kappa e a concordância entre as metodologias, considerando a análise da microscopia de imunofluorescência como padrão-ouro para avaliação de normalidade do fuso e distribuição cromossômica oocitária. **RESULTADOS:** Observou-se que 72,7% dos oócitos em metáfase II com fuso celular não visível à polarização apresentaram anomalias meióticas à análise confocal e que 55,6% dos oócitos em metáfase II com fuso celular visível à polarização apresentaram-se como oócitos anormais à análise confocal. Somente 44,4% dos oócitos com fuso celular visível à polarização apresentaram-se como normais à análise confocal. A concordância entre os métodos foi de 51,1% (Kappa: 0,11; IC95% -0,0958–0,319). **CONCLUSÕES:** A baixa concordância entre a microscopia de polarização e a confocal na avaliação do fuso meiótico oocitário sugere que a visualização do fuso meiótico de oócitos humanos em metáfase II pela microscopia de polarização tem limitado o valor preditivo de normalidade meiótica oocitária.

Abstract

PURPOSE: To evaluate the concordance between polarization microscopy and confocal microscopy techniques in the evaluation of the meiotic spindle of human oocytes matured *in vivo*. **METHODS:** Prospective study that evaluated oocytes with the first polar extruded body obtained from infertile women who had undergone ovarian stimulation for intracytoplasmic sperm injection. The oocytes with the first polar extruded body were evaluated by polarization microscopy and were then immediately fixed and stained for microtubule and chromatin evaluation by high-performance confocal microscopy. We determined the correlation of polarization microscopy with confocal microscopy in the detection of meiotic oocyte anomalies, and we also evaluated the percentage of oocytes with a visible and non-visible cell spindle by polarization microscopy and with meiotic normality and abnormalities by confocal microscopy. Confidence intervals, Kappa's index and concordance between the methodologies were calculated, considering immunofluorescence microscopy analysis as the golden-standard for evaluating normal spindle and oocyte chromosome distribution. **RESULTS:** We observed that 72.7% of metaphase II oocytes with a nonvisible meiotic spindle by polarization microscopy showed no meiotic abnormalities by confocal analysis and 55.6% of metaphase II oocytes with a visible meiotic spindle by polarization microscopy were found to be abnormal oocytes by the confocal analysis. Only 44.4% of oocytes with a visible meiotic spindle by polarization microscopy were found to be normal by confocal analysis. Concordance

Correspondência

Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro
Setor de Reprodução Humana, Departamento de Ginecologia
e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo
Avenida Bandeirantes, 3.900 – Monte Alegre
CEP: 14049-900
Ribeirão Preto (SP), Brasil

Recebido

20/06/2012

Aceito com modificações

25/09/2012

Trabalho realizado no Setor de Reprodução Humana, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

¹Programa de Pós-graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

²Laboratório de Reprodução Assistida do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

³Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

⁴Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Hormônios e Saúde da Mulher, Brasil.

Conflito de interesses: não há.

between the methods was 51.1% (Kappa: 0.11; 95%CI -0.0958–0.319). **CONCLUSIONS:** The low correlation between polarization microscopy and confocal microscopy in the assessment of oocyte meiotic spindle suggests that visualization of the meiotic spindle of human oocytes at metaphase II by polarization microscopy is not a good indicator of oocyte meiotic normality.

Introdução

A qualidade oocitária depende da adequada aquisição de maturação citoplasmática e nuclear, sendo a última dependente da presença de um fuso celular normal. O fuso celular oocitário é uma estrutura extremamente sensível à ação de diversos fatores, tais como o envelhecimento, as mudanças térmicas, o suporte insuficiente de oxigênio durante o tempo de cultura, a manipulação oocitária, entre outros¹⁻⁴. Alterações ao fuso meiótico podem gerar alteração no complemento cromossômico, induzindo um estado de aneuploidia por não disjunção, junção desbalanceada ou disjunção prematura das cromátides e perda de cromossomos, o que compromete o desenvolvimento embrionário⁵⁻⁸.

O fuso meiótico pode ser visualizado por meio da microscopia confocal (MC) de elevado desempenho, que oferece informações detalhadas das estruturas microtubulares e dos cromossomos, sendo considerada a metodologia de padrão-ouro para avaliação desta estrutura celular⁹⁻¹¹. Entretanto, esta metodologia requer a fixação dos oócitos, o que inviabiliza sua utilização subsequente nos procedimentos de reprodução assistida (RA).

Considerando a relevância de se avaliar as qualidades oocitária e embrionária com a finalidade de se aperfeiçoar os resultados dos procedimentos de RA, cada vez mais têm sido estudadas e empregadas metodologias com esta finalidade. Atualmente, um dos métodos não invasivos mais estudados é a microscopia de polarização (MP)¹²⁻¹⁴, que permite a análise de estruturas birrefringentes, como o fuso celular oocitário e a zona pelúcida sem a necessidade de fixação do oócito, não comprometendo os resultados de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)^{12,13,15,16}.

Discute-se a aplicabilidade clínica da MP como preditora da qualidade oocitária e dos resultados da ICSI em humanos^{12,13,15,16}, pois a mesma potencialmente permitiria a avaliação do estágio de maturação nuclear oocitário¹⁷ e a visualização ou não desta estrutura celular. Todavia, apesar de alguns estudos sugerirem que a visualização do fuso meiótico pela MP possa ser utilizada como preditora indireta dos resultados da ICSI^{14,18-23}, não há consenso na literatura sobre sua aplicabilidade clínica²⁴.

Estudos experimentais, utilizando camundongos, evidenciaram adequada capacidade preditora desta metodologia para identificação de anomalias meióticas oocitárias^{25,26}. Todavia, o fuso celular humano apresenta especificidades próprias, sendo necessários estudos para

comparar a acurácia desta metodologia para a predição de normalidade do fuso e distribuição cromossômica. Devido à dificuldade em se conseguir oócitos humanos maturados *in vivo* que sejam doados para a pesquisa, não há, até o presente, estudos comparativos da concordância entre as técnicas de MP e MC na detecção de anomalias meióticas oocitárias. Existe apenas um estudo¹⁰ comparando essas duas técnicas, no qual foram analisados parâmetros quantitativos do fuso celular pela MP, comparando-os com a análise da morfologia do fuso meiótico e da distribuição cromossômica pela MC. Além de ter avaliado apenas um dos dois sistemas disponíveis comercialmente, este estudo não apresentou dados relativos à avaliação de parâmetros quantitativos do fuso (visualização ou não da estrutura) pela MP e sua acurácia na predição das anomalias meióticas oocitárias, permanecendo esta lacuna no conhecimento.

Devido à importância de serem identificadas metodologias não invasivas capazes de prever a qualidade oocitária em procedimentos de RA e a escassez de dados na literatura sobre a capacidade da MP de identificação de anomalias meióticas em oócitos humanos, foi proposta a realização do presente estudo. Objetivou-se comparar a concordância entre as técnicas MP e MC na avaliação do fuso meiótico de oócitos humanos maturados *in vivo*, avaliando a percentagem de oócitos com fuso celular visível e não visível à MP com normalidade e anomalia meiótica à MC.

Métodos

Foi realizado um estudo prospectivo de junho de 2009 a maio de 2011, no Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Pesquisa. Todos os casais submetidos à indução da ovulação para a realização de ICSI, que preencheram os critérios de inclusão e manifestaram o desejo de participar do projeto, assinaram o termo de consentimento após esclarecimentos sobre o estudo.

Ao longo dos 24 meses de duração do estudo, 23 pacientes preencheram os critérios de inclusão e manifestaram o desejo de participar, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Foram incluídas pacientes inférteis com idade menor ou igual a 38 anos, que apresentaram mais de sete oócitos maduros captados após estimulação ovariana com gonadotrofinas.

O bloqueio hipofisário foi iniciado utilizando agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa) dez dias antes da realização da ultrassonografia transvaginal basal (protocolo longo), por meio da administração de acetato de Leuprolide (Lupron[®], Abbott, Brasil). As pacientes receberam 100 a 300 UI por dia de FSH recombinante – FSHr (Gonal-F[®], Serono, Brasil; Puregon[®], Organon, Brasil), nos primeiros seis dias da indução. Quando pelo menos dois folículos atingiram 18 mm de diâmetro médio administraram-se gonadotrofina coriônica humana (hCG) recombinante (Ovidrel[®], Serono, Brasil). A captação dos oócitos foi realizada entre 34 a 36 horas após a administração do hCG recombinante.

Todo o material aspirado durante a captação dos oócitos foi analisado para a identificação e o isolamento dos complexos oócito-cumulus. Após a conclusão do desnudamento oocitário, realizou-se a identificação do grau de maturidade dos oócitos, sob visualização ao microscópio de luz. Os oócitos imaturos (em estágio de vesícula germinativa ou metáfase I) foram descartados, já os maduros (caracterizados morfológicamente pela presença de um corpúsculo polar – CP extruído) foram incubados por mais uma hora (após o desnudamento oocitário) para, então, serem avaliados pelo OCTAX ICSI Guard[™] System (Medical Technology Vertriebs-GmbH, Altdorf, Alemanha). Sete oócitos maduros foram injetados (submetidos à ICSI) seguindo a rotina assistencial do serviço, e os demais foram doados para o presente estudo.

■ Visualização do fuso meiótico por meio da microscopia de polarização

Os fusos celulares dos oócitos com extrusão do primeiro CP foram avaliados usando um microscópio invertido, equipado com uma câmera de vídeo e com o *hardware* do MP, o qual consiste de cristais elétricos e de um controlador eletro-óptico (OCTAX ICSI Guard[™] System, Medical Technology Vertriebs-GmbH, Altdorf, Alemanha). Os grupos de cristais elétricos são controlados pelo computador por meio do *software* OCTAX EyeWare[™] (Universal Imaging Corp., Boston, MA, EUA). Utilizou-se um número máximo de sete oócitos em cada placa, sendo o tempo necessário para analisar o fuso celular pela MP e realizar a ICSI inferior ou igual a sete minutos.

Para controlar os vieses metodológicos relativos a não visualização do fuso secundária à realização do desnudamento celular e ao envelhecimento oocitário, padronizou-se que o desnudamento fosse realizado de duas a três horas após a captação oocitária e, após o mesmo, os oócitos eram recolocados nas placas de cultivo previamente equilibradas na incubadora, por mais uma hora, para somente depois serem submetidos ao imageamento e à ICSI.

Os oócitos com primeiro CP foram analisados pela MP e caracterizados quanto ao estágio de maturação nuclear

(telófase I ou metáfase II) e presença ou não de fuso celular visível. Foram considerados em telófase I, os oócitos que apresentavam fuso celular alongado, perpendicular à membrana oocitária, estendendo-se até o primeiro CP. Os fusos celulares em metáfase II foram caracterizados pela presença de fibras birrefringentes distribuídas radialmente, com a forma de barril e orientadas paralelamente à membrana cortical (Figura 1A). Como os cromossomos são minimamente birrefringentes, não são adequadamente analisáveis por meio desta metodologia.

■ Microscopia de imunofluorescência para visualização do fuso meiótico e distribuição cromossômica

Os oócitos maduros doados para a pesquisa foram fixados e corados para microscopia de fluorescência, conforme previamente descrito^{17,18,27}.

Para maior acurácia das análises, os oócitos em metáfase II foram subdivididos em analisáveis, quando se apresentavam em visão lateral ou sagital, possibilitando uma avaliação global do fuso meiótico; e não analisáveis, quando se apresentavam em visão polar, impossibilitando a avaliação global do fuso, apenas da disposição cromossômica^{28,29}. Na avaliação por imunofluorescência, o fuso meiótico foi considerado normal quando apresentava a forma de barril e estava disposto em posição centrípeta em relação ao CP (Figura 1B). Os cromossomos apresentavam distribuição normal quando estavam reunidos na placa metafásica e bem alinhados no equador do fuso celular oocitário (Figura 1B). Eram considerados anormais quando se encontravam dispersos, desalinhados ou fragmentados, ou quando havia cromatina feminina aglomerada com microtúbulos interfásicos. Os oócitos em metáfase II foram considerados normais quando apresentavam um fuso meiótico em forma de barril, com cromossomos alinhados na placa metafásica e um CP (Figura 1B); e anormais, quando apresentavam fuso e/ou configuração cromossômica alterados.

O fuso celular foi considerado em telófase I quando estava alongado, perpendicular à membrana plasmática oocitária e com cromossomos distribuídos na sua porção terminal.

■ Análise estatística

Inicialmente, realizou-se uma descrição da amostra, sendo as variáveis qualitativas apresentadas como frequências absolutas e relativas.

Para comparação dos métodos de avaliação do fuso meiótico oocitário (MP e MC), considerando a análise pela MC como padrão-ouro, utilizou-se o teste de concordância de Kappa: <0,0, ruim; 0,21–0,40, sofrível; 0,41–0,60, regular; 0,61–0,80, boa; 0,81–0,99, ótima e >1,00, perfeita. Foram também apresentados os intervalos de confiança de 95% (IC95%) para cada variável analisada: oócitos sem fuso celular visível à MP e com normalidade

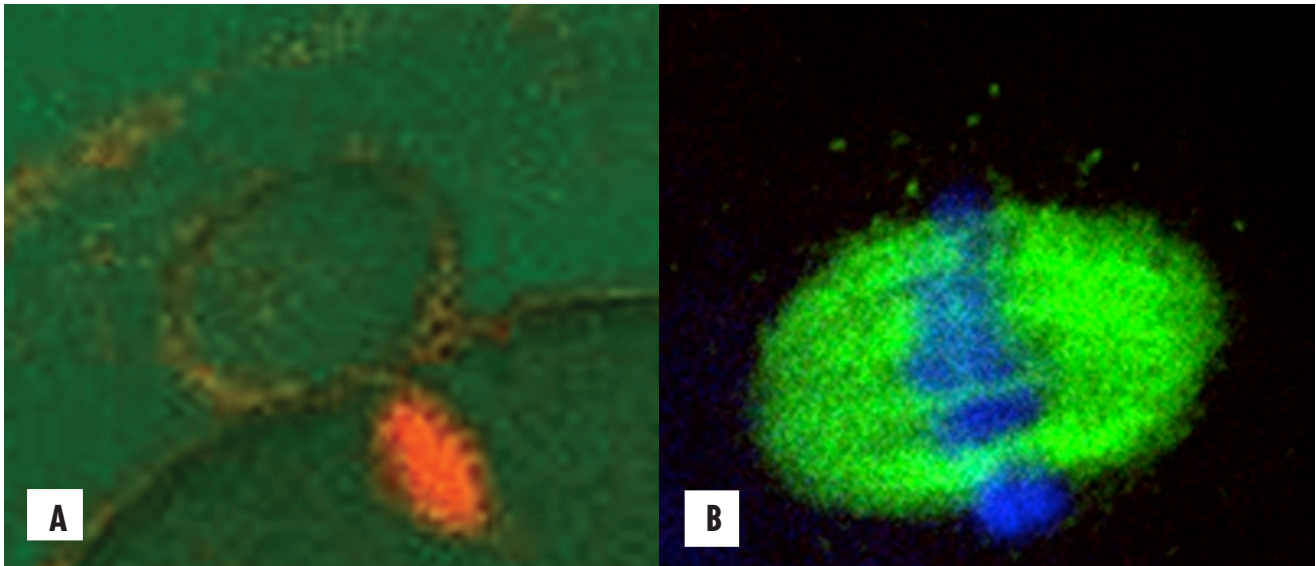


Figura 1. Oócitos humanos com extrusão do primeiro corpúsculo polar, avaliados pela microscopia de polarização e/ou confocal de alto desempenho. (A) Fuso celular em metáfase II avaliado pela microscopia de polarização; (B) fuso celular em metáfase II, apresentando-se normal em forma de barril e com cromossomos alinhados na placa metafásica segundo análise pela microscopia confocal de alto desempenho. A cor verde representa os microtúbulos formando o fuso celular e a azul, cromossomos. Escala = 10 μ m.

meiótica pela análise pela MC; com fuso celular visível à MP e com normalidade meiótica pela análise pela MC; sem fuso celular visível à MC e com anormalidade meiótica pela análise pela MC; e com fuso celular visível à MC e com anormalidade meiótica pela análise pela MC.

Resultados

Foram analisados 73 oócitos frescos, oriundos de 23 pacientes. A análise pela MP evidenciou três oócitos em telófase I (4,3%) e 70 em metáfase II (95,7%), sendo 54 com o fuso celular visível (77,1%) e 16 sem (22,9%). A análise com MC evidenciou seis oócitos em telófase I (8,2%) e 67 em metáfase II (91,8%). Dos 67 oócitos em metáfase II, 47 foram fixados em visão sagital (70,1%), sendo considerados analisáveis no presente estudo, 4 apresentaram fuso celular não visível (6%) e 16 foram fixados em visão polar (23,9%), sendo considerados não analisáveis. Todos os oócitos que estavam em telófase I foram fixados em visão sagital e apresentaram análise confocal normal. Dos 47 oócitos em metáfase II analisáveis, 28 apresentaram fuso e distribuição cromossômica anormais (59,6%) e 19 apresentaram normalidade meiótica (40,4%).

Dos 16 oócitos com fuso celular não visível à polarização, dois deles também apresentaram fuso negativo à análise confocal, três estavam em visão polar, dois em telófase I e nove em visão sagital. Dos 54 oócitos com fuso celular visível à polarização, dois oócitos apresentaram fuso negativo à análise confocal, 13 estavam em visão polar, um estava em telófase I e 38 em visão sagital.

Observou-se que 72,7% (8/11) dos oócitos em metáfase II com fuso celular não visível à polarização apresentaram anormalidades meióticas à análise confocal (IC 46,4–99,1) e 55,6% (20/36) dos oócitos em metáfase II com fuso celular visível à polarização apresentaram-se como oócitos anormais à análise confocal (IC 39,3–71,8). Somente 27,3% (3/11) dos oócitos em metáfase II com fuso celular não visível à polarização apresentaram normalidades meióticas à análise confocal (IC 0,01–53,6). Dos oócitos em metáfase II com fuso celular visível à polarização, 44,4% (16/36) apresentaram-se como oócitos normais à análise confocal (IC 28,2–60,7). A concordância entre os métodos foi de apenas 51,1% (Kappa: 0,11; IC95% -0,0958–0,319). Para esta análise foram descartados os oócitos em telófase I (n=6), aqueles com fuso negativo à imunofluorescência (n=4) e que foram fixados em visão polar (n=16), como observado na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre as técnicas de microscopia de polarização e confocal em relação à visualização ou não do fuso meiótico de oócitos humanos maturados *in vivo* à microscopia de polarização e presença ou não de anomalias meióticas à microscopia confocal

Microscopia de polarização	Microscopia confocal						Total
	Anormal			Normal			
	n	%	IC95%	n	%	IC95%	
Fuso não visível	8	72,7	46,4–99,1	3	27,3	0,01–53,6	11
Fuso visível	20	55,6	39,3–71,8	16	44,4	28,2–60,7	36
Total	28			19			47

Anormalidade meiótica: presença de anomalias do fuso meiótico e/ou da distribuição cromossômica; normalidade meiótica: presença de um fuso celular normal em forma de barril, com os cromossomos distribuídos na placa metafásica. Concordância entre os métodos: 51,1%. Kappa: 0,11 (IC95% -0,096–0,319).

Discussão

Com a crescente demanda de pacientes inférteis à procura de serviços de reprodução humana, cada vez mais aumenta o interesse na aplicabilidade e segurança dos métodos não invasivos para avaliação da qualidade oocitária, importante determinante da qualidade embrionária, visando aumentar a segurança e a eficiência dos procedimentos de RA.

Um dos principais métodos não invasivos destinados à avaliação da qualidade oocitária por meio da análise do fuso celular é a MP, que possibilita a visualização de estruturas birrefringentes em células vivas, sem a necessidade de fixação ou coloração, permitindo a utilização dos oócitos analisados por esta metodologia nos procedimentos de RA^{13,15,18,25,30,31}. A análise oocitária por esta metodologia poderia ser útil na triagem de possíveis anormalidades, não só do fuso celular, como, indiretamente, do alinhamento cromossômico, uma vez que, na grande maioria das vezes, estas duas alterações estão associadas^{26,32}. Alguns estudos^{13,23} evidenciaram aumento significativo na taxa de fertilização, de clivagem e de embriões de boa qualidade no terceiro dia de desenvolvimento de oócitos com fuso celular visível, quando comparados àqueles sem fuso celular visível à polarização²³. Isso sugere que a visualização do fuso meiótico oocitário poderia ser um bom preditor de fertilização pós-ICSI^{18-22,33} e da qualidade embrionária^{14,18-23}. Entretanto, alguns estudos na literatura não confirmaram essa correlação, tornando questionável sua utilização rotineira para a seleção oocitária^{19,31,33}. Como até o presente não havia estudos avaliando a concordância entre esta metodologia não invasiva e a MC na predição de anomalias meióticas oocitárias em humanos, o presente estudo foi realizado.

No presente estudo, observou-se que 72,7% dos oócitos com fuso celular não visível à polarização apresentaram anormalidades meióticas à análise confocal, sugerindo que isso está relacionado a maior probabilidade de anormalidade meiótica oocitária, como previamente sugerido por alguns estudos. Todavia, 55,6% dos oócitos com fuso celular visível à polarização apresentaram-se como oócitos anormais à análise confocal e somente 44,4% dos oócitos com fuso celular visível à polarização apresentaram-se com fuso e distribuição normal à análise confocal. A concordância entre os métodos foi de apenas 51,1%, evidenciando que a visualização do fuso celular à MP não é uma boa preditora de normalidade meiótica oocitária, tornando questionável a aplicabilidade desta metodologia na predição não invasiva da

qualidade oocitária. Estes achados são concordantes com os apresentados por Cotichio et al.¹⁰, os quais, ao analisarem oócitos maturados *in vivo* (frescos e após descongelamento) pelo Polscope, o outro sistema de polarização disponibilizado comercialmente, evidenciaram não haver consistência entre a análise pela metodologia não invasiva e a confocal, sugerindo que esta metodologia apresentou limitado valor preditivo do grau de normalidade do fuso meiótico oocitário. Todavia, no mesmo estudo¹⁰, as variáveis analisadas para a comparação das técnicas foram distintas das do presente estudo. Foram comparados os valores de birrefringência do fuso pela análise ao Polscope entre quatro diferentes configurações de microtúbulos (análise de parâmetros quantitativos e não qualitativos) e distribuição cromossômica, definidas pela análise confocal, além das medidas do eixo longitudinal do fuso avaliadas pelas duas metodologias.

Vale a pena ressaltar que a utilização da MP na prática clínica prevê a necessidade de aquisição do equipamento e de *softwares*, a utilização de placas com fundo de vidro, cujo custo é significativamente maior que o das placas de plástico habitualmente utilizadas para a realização da ICSI, além do treinamento e gasto adicional de tempo pelos embriologistas, o que, aliado à baixa concordância entre esta técnica e a MC na identificação das anormalidades meióticas em oócitos humanos, evidenciada no presente estudo, faz questionar se a utilização desta metodologia na rotina das clínicas de RA é realmente custo-efetiva, o que precisa ser mais bem definido por estudos com maiores casuísticas e metodologias pertinentes.

Pode-se concluir que a visualização do fuso da MP não é uma boa preditora na detecção de normalidade meiótica oocitária quando comparada à MC de elevado desempenho. A pequena porcentagem de oócitos com fuso visível à polarização e normais à análise confocal torna questionável a utilidade desta metodologia como ferramenta para a seleção não invasiva oocitária para os procedimentos de RA.

Agradecimentos

Aos funcionários do Laboratório de Reprodução Assistida do Hospital das Clínicas, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2008/58197-6) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (474858/2009-0).

Referências

- Hu Y, Betzendahl I, Cortvrindt R, Smits J, Eichenlaub-Ritter U. Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. *Hum Reprod.* 2001;16(4):737-48.
- Eichenlaub-Ritter U, Shen Y, Tinneberg HR. Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus. *Reprod Biomed Online.* 2002;5(2):117-24.
- Mullen SF, Agca Y, Broermann DC, Jenkins CL, Johnson CA, Critser JK. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. *Hum Reprod.* 2004;19(5):1148-54.
- Roberts R, Franks S, Hardy K. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Hum Reprod.* 2002;17(11):2950-6.
- Mandelbaum J, Anastasiou O, Lévy R, Guérin JF, de Larouzière V, Antoine JM. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;113 Suppl 1:S17-23.
- Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod.* 1996;11(10):2217-22.
- Van Blerkom J, Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod.* 1992;7(3):379-90.
- Jones KT, Lane SI. Chromosomal, metabolic, environmental, and hormonal origins of aneuploidy in mammalian oocytes. *Exp Cell Res.* 2012;318(12):1349-9.
- Miyara F, Aubriot FX, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A, et al. Multiparameter analysis of human oocytes at metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. *Hum Reprod.* 2003;18(7):1494-503.
- Coticchio G, Sciajno R, Hutt K, Bromfield J, Borini A, Albertini DF. Comparative analysis of the metaphase II spindle of human oocytes through polarized light and high-performance confocal microscopy. *Fertil Steril.* 2010;93(6):2056-64.
- Yu Y, Yan J, Liu ZC, Yan LY, Li M, Zhou Q, et al. Optimal timing of oocyte maturation and its relationship with the spindle assembly and developmental competence of in vitro matured human oocytes. *Fertil Steril.* 2011;96(1):73-78.
- Korkmaz C, Cinar O, Akyol M. The relationship between meiotic spindle imaging and outcome of intracytoplasmic sperm injection: a retrospective study. *Gynecol Endocrinol.* 2011;27(10):737-41.
- Petersen CG, Oliveira JB, Mauri AL, Massaro FC, Baruffi RL, Pontes A, et al. Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcomes: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2009;18(2):235-43.
- Tomari H, Honjou K, Nagata Y, Horiuchi T. Relationship between meiotic spindle characteristics in human oocytes and the timing of the first zygotic cleavage after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28(11):1099-104.
- Wang WH, Keefe DL. Prediction of chromosome misalignment among in vitro matured human oocytes by spindle imaging with the PolScope. *Fertil Steril.* 2002;78(5):1077-81.
- Hyun CS, Cha JH, Son WY, Yoon SH, Kim KA, Lim JH. Optimal ICSI timing after the first polar body extrusion in in vitro matured human oocytes. *Hum Reprod.* 2007;22(7):1991-5.
- Barcelos ID, Vieira RC, Ferreira EM, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA. Comparative analysis of the spindle and chromosome configurations of in vitro-matured oocytes from patients with endometriosis and from control subjects: a pilot study. *Fertil Steril.* 2009;92(5):1749-52.
- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. *Hum Reprod.* 2001;16(7):1464-8.
- Cohen Y, Malcov M, Schwartz T, Mey-Raz N, Carmon A, Cohen T, et al. Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI? *Hum Reprod.* 2004;19(3):649-54.
- Shen Y, Stalf T, Mehnert C, De Santis L, Cino I, Tinneberg HR, et al. Light retardance by human oocyte spindle is positively related to pronuclear score after ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2006;12(6):737-51.
- Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K. Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reprod Biomed Online.* 2007;14(2):166-74.
- Madaschi C, Bonetti TCS, Braga DPAF, Pasqualotto FF, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation. *Fertil Steril.* 2008;90(1):194-8.
- Magli MC, Capoti A, Resta S, Stanghellini I, Ferraretti AP, Gianaroli L. Prolonged absence of meiotic spindles by birefringence imaging negatively affects normal fertilization and embryo development. *Reprod Biomed Online.* 2011;23(6):747-54.
- Dib LA, Araújo MC, Giorgenon RC, Ferriani RA, Navarro PA. Apparently matured oocytes injected in telophase I have worse outcomes from assisted reproduction. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2012;34(5):203-8.
- Navarro PA, Liu L, Trimarchi JR, Ferriani RA, Keefe DL. Noninvasive imaging of spindle dynamics during mammalian oocyte activation. *Fertil Steril.* 2005;83 Suppl 1:1197-205.
- Navarro PA, Liu L, Ferriani RA, Keefe DL. Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice. *Fertil Steril.* 2006;85 Suppl 1:1187-94.
- Allworth AE, Albertini DF. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev Biol.* 1993;158(1):101-12.
- Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, Yang X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2005;64(8):1677-89.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Ferriani RA, Navarro PA. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after in vitro maturation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009;145(1):76-80.
- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Oldenbourg R, Keefe DL. Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril.* 2002;77(6):1274-7.
- Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Hum Reprod.* 2003;18(4):817-20.
- Navarro PA, Liu L, Keefe DL. In vivo effects of arsenite on meiosis, preimplantation development, and apoptosis in the mouse. *Biol Reprod.* 2004;70(4):980-5.
- Renzi L, Ubaldi F, Martinez F, Iacobelli M, Minasi MG, Ferrero S, et al. Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod.* 2003;18(6):1289-93.