

LUCIANA AZÓR DIB¹

MARIA CRISTINA PICINATO MEDEIROS DE ARAÚJO²

ROBERTA CRISTINA GIORGENON²

RUI ALBERTO FERRIANI³

PAULA ANDREA DE ALBUQUERQUE SALES NAVARRO³

Oócitos aparentemente maduros injetados em telófase I apresentam piores resultados de reprodução assistida

Apparently matured oocytes injected in telophase I have worse outcomes from assisted reproduction

Artigo Original

Palavras-chave

Endometriose
Indução da ovulação/métodos
Injeções de espermatozóides intracitoplasmáticas
Metáfase
Microscopia de polarização
Oócitos/citologia
Técnicas de maturação *in vitro* de oócitos
Telófase

Keywords

Endometriosis
Ovulation induction/methods
Sperm injections, intracytoplasmic
Metaphase
Microscopy, polarization
Oocytes/cytology
In Vitro Oocyte Maturation Techniques
Telophase

Resumo

OBJETIVO: Avaliar o estágio de maturação nuclear de oócitos com o primeiro corpúsculo polar (CP) visível de pacientes inférteis submetidas à estimulação ovariana para injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e comparar os resultados da injeção intracitoplasmática de espermatozoide entre os oócitos em telófase I (TI) e metáfase II (MII), e entre aqueles em metáfase II com e sem fuso celular visível. **MÉTODOS:** Estudo prospectivo que incluiu 106 pacientes inférteis submetidas à injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Foram incluídas pacientes com idade menor ou igual a 38 anos, hormônio folículo estimulante (FSH) basal menor que 10 mIU/mL e índice de massa corpórea (IMC) menor que 30 kg/m². Foram excluídas pacientes com doenças sistêmicas, com qualquer infecção ativa, tabagistas ou que fizeram uso de medicações hormonais e anti-inflamatórias hormonais e não hormonais nos últimos dois meses, previamente à programação para o procedimento de reprodução assistida. Os oócitos com extrusão do primeiro corpúsculo polar foram avaliados pela microscopia de polarização, imediatamente antes da realização da injeção intracitoplasmática de espermatozoide, e caracterizados quanto ao estágio de maturação nuclear (telófase I ou metáfase II). Os oócitos em metáfase II foram avaliados de acordo com a presença ou não do fuso meiótico. Foram analisadas as taxas de fertilização, clivagem e o número de embriões de boa qualidade no segundo dia (D2) de desenvolvimento. Os dados foram analisados comparativamente através do teste exato de Fisher. Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5% (p<0,05). **RESULTADOS:** O fuso meiótico de 516 oócitos foi visualizado através da microscopia de polarização. Dezesete dos 516 oócitos avaliados estavam em telófase I (3,3%) e 499 (96,7%) em metáfase II. Os oócitos injetados em telófase I apresentaram taxas de fertilização significativamente menores do que os injetados em metáfase II (53 e 78%, respectivamente) e não produziram nenhum embrião de boa qualidade no segundo dia. Comparando-se os oócitos com e sem fuso celular visível, não foi observada diferença significativa nos resultados de injeção intracitoplasmática de espermatozoide. **CONCLUSÕES:** Oócitos injetados em telófase I apresentaram menores taxas de fertilização quando comparados aos em metáfase II. É possível que a análise do estágio de maturação nuclear oocitária, por meio da microscopia de polarização, possa ser utilizada como fator de predição das taxas de fertilização pós-injeção intracitoplasmática de espermatozoide.

Abstract

PURPOSE: To evaluate the nuclear maturation stage and the presence of meiotic spindles of *in vivo* matured oocytes from infertile women undergoing stimulated cycles for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and compare intracytoplasmic sperm injection outcomes between oocytes in telophase I (TI) and metaphase II (MII), and the ones with and without visible meiotic spindle. **METHODS:** A prospective and controlled study with 106 infertile patients who underwent ovarian stimulation for intracytoplasmic sperm injection purposes. Patients aged 38 years or less, with basal follicle stimulating hormone (FSH) less than 10 mIU/mL and body mass index (BMI) less than 30 kg/m². Were included patients

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
Av. Bandeirantes 3900 – Monte Alegre
CEP: 14049-900
Ribeirão Preto (SP), Brasil

Recebido

28/02/12

Aceito com modificações

30/03/12

Trabalho realizado no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 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.

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

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

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

Fonte de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – processos 2008/58197-6; CNPq (Edital Universal) – processo 474858/2009-0.

Conflito de interesses: não há.

presenting any systemic diseases, any active infection, smokers or patients who had been using hormonal medications and hormonal and nonhormonal anti-inflammatory drugs for the past two months prior to the assisted reproduction procedure were excluded. The oocytes with the first polar body extruded (*in vivo* matured oocytes) were imaged by polarization microscopy immediately before intracytoplasmic sperm injection and characterized according to nuclear maturation stage (telophase I and metaphase II) and to the presence of a meiotic spindle. We analyzed the fertilization rates, cleavage, number of good quality embryos on the second day (D2) from oocytes on telophase I versus those in metaphase II, and metaphase II visible spindle versus non-visible ones. Data were analyzed comparatively by Fisher's exact test. The level of significance was set at 5% in all analyses ($p < 0.05$). **RESULTS:** The meiotic spindles of 516 oocytes were imaged using polarization microscopy. From the 516 oocytes analyzed, seventeen were in telophase I (3.3%) and 499 (96.7%) in metaphase II. The oocytes injected in telophase I had significantly lower fertilization rates than those injected in metaphase II (53 and 78%, respectively) and produced no good quality embryos on day 2. When the oocytes with and without a visible meiotic spindle were compared, there was no significant difference in the intracytoplasmic sperm injection results. **CONCLUSIONS:** Oocytes injected in telophase I showed lower fertilization rates when compared to those in metaphase II. It is possible that the analysis of oocyte nuclear maturation by polarization microscopy can be used as a predictor of fertilization after intracytoplasmic sperm injection.

Introdução

Métodos não invasivos para a avaliação da qualidade oocitária, importante determinante da qualidade embrionária e sucesso dos procedimentos de reprodução assistida, são muito importantes quando se trabalha com um material limitado e valioso como os óvulos humanos.

Sabe-se que para o oócito maduro estar preparado para a fertilização é necessário que o fuso meiótico, estrutura fundamental no processo de desenvolvimento oocitário, mantenha a sua integridade e funcionabilidade¹⁻³. Um fuso funcionante, essencial em oócitos sadios em metáfase II (MII), garante a fidelidade da segregação cromossômica⁴⁻⁶. A metodologia considerada como padrão-ouro para a avaliação dessa estrutura celular é a imuno-histoquímica com análise confocal dos microtúbulos e distribuição cromossômica^{7,8}. Todavia, essa metodologia requer a fixação dos oócitos, inviabilizando a sua utilização subsequente nos procedimentos de reprodução assistida. Com a padronização e a utilização da microscopia de polarização, que permite a análise de estruturas birrefringentes, como o fuso celular oocitário, sem comprometer a sua viabilidade e utilização clínica subsequente, têm surgido diversos estudos avaliando a aplicabilidade clínica dessa metodologia como preditora da qualidade oocitária e dos resultados dos procedimentos de reprodução assistida (RA)^{3,9-11}.

A microscopia de polarização permite ao embriologista avaliar o estágio de maturação nuclear oocitário¹², a visualização ou não dessa estrutura celular, assim como a sua localização em relação ao primeiro corpúsculo polar (CP)¹³. A visualização do fuso meiótico em oócitos pode ter importância clínica em prever a fertilização pós-injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)¹⁴⁻¹⁹ e a qualidade embrionária^{14,16-19}. Por um lado, entretanto, alguns estudos na literatura não confirmaram essa correlação^{13,20}. Por outro, a identificação da posição do fuso meiótico em relação ao primeiro CP pode prevenir os embriologistas de danificarem essa importante estrutura celular durante

a ICSI^{11,13}, o que também poderia estar relacionado ao resultado dos procedimentos de RA. Além disso, a visualização do fuso meiótico pode ser usada para selecionar oócitos que serão injetados na ICSI e apresentando especial relevância clínica em países onde existe um limite legal do número de oócitos a serem fertilizados³ e de embriões transferidos²¹.

Como os dados apresentados pela literatura internacional são controversos, no presente estudo, objetiva-se avaliar o estágio de maturação nuclear de oócitos com o primeiro CP visível de pacientes inférteis submetidas à estimulação ovariana para ICSI e comparar os resultados da ICSI entre os oócitos em telófase I (TI) e MII, e entre aqueles em MII com e sem fuso celular visível.

Métodos

Foi realizado um estudo prospectivo de março de 2008 a setembro de 2009, junto ao Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP/USP. Esse estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Pesquisa e 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 pós-informado.

Cento e seis pacientes preencheram os critérios de inclusão no período do estudo. Foram incluídas pacientes com idade menor ou igual a 38 anos, hormônio folículo estimulante (FSH) basal menor que 10 mIU/mL e índice de massa corpórea (IMC) menor que 30 kg/m². Excluíram-se pacientes com diabetes *mellitus* ou quaisquer outras endocrinopatias, doença cardiovascular, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas, infecção pelo vírus HIV, qualquer infecção ativa, tabagismo ou o uso de medicações hormonais e anti-inflamatórias hormonais e não hormonais nos últimos dois meses, previamente à programação para o procedimento de reprodução assistida.

■ Protocolo de estimulação ovariana controlada

O bloqueio hipofisário foi iniciado usando agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH_a) dez dias antes do dia de realização da ultrassonografia transvaginal basal (protocolo longo), por meio da administração de acetato de leuprolide (Lupron[®], Abbott, Brasil). As pacientes receberam 100–300 UI por dia de FSH recombinante (FSHr) (Gonal-F[®], Serono, Brasil; Puregon[®], Organon, Brasil), nos primeiros 6 dias da indução. Quando, pelo menos, 2 folículos atingissem 18 mm de diâmetro médio, administrava-se gonadotrofina coriônica humana (hCG) recombinante (Ovidrel[®], Serono, Brasil). A captação dos oócitos foi realizada 34–36 horas após a administração do hCG recombinante.

■ Preparação oocitária

Todo material aspirado durante a captação dos oócitos foi analisado para a identificação e o isolamento dos complexos oócito-*cumulus*. Depois de identificados, os complexos oócito-*cumulus* foram isolados do fluido folicular, colocados em placa separada e lavados cuidadosamente em meio de cultura *Human Tubal Fluid-Hepes* (HTF, Irvine Scientific) para a remoção de sangue e debris. A seguir, foram colocados em placas NUNC (Multidish 4 wells Nuclon, Delta SI), preenchidas com o meio de cultura HTF e cobertas com óleo mineral, e levados à incubadora em mistura gasosa de CO₂ a 5%, sob condições ideais de temperatura (37°C) e umidade (95%) por um período de 2–3 horas. Após esse período, para se realizar a remoção do *Cumulus oophorus* e da *Corona radiata*, os complexos oócito-*cumulus* foram colocados em microgotas de 25 µL de hialuronidase (H4272 tipo IV-S, Sigma), na diluição de 80 UI/mL de HTF/Hepes (Irvine Scientific), por, no máximo, 30 segundos e, então, lavados 2 ou 3 vezes com o meio HTF modificado (HTF/Hepes, Irvine Scientific) suplementado com Soro Sintético Substituto (SSS) a 10%. A remoção mecânica dos restos celulares foi feita com o auxílio de uma pipeta de desnudação (*stripper pipette* 130 µm *denuding pipette*, Cook, Melbourne, Austrália).

Após a realização do desnudamento oocitário (remoção do *Cumulus oophorus*), 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 MI) foram descartados. Os oócitos maduros (caracterizados morfológicamente pela presença de um corpúsculo polar extruso) foram incubados em gotas de 25 µL de HTF+SSS 10% por mais 1 hora (após o desnudamento oocitário) para, então, serem avaliados pelo Octax ICSI Guard[™] System (Medical Technology Vertriebs-GmbH, Altdorf, Germany) e injetados por meio da realização da ICSI.

■ 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 vídeo câmera e com o *hardware* do microscópio de polarização, o qual consiste de cristais elétricos e de um controlador eletro-óptico (Octax ICSI Guard[™] System, Medical Technology Vertriebs-GmbH, Altdorf, Germany). Os grupos de cristais elétricos são controlados pelo computador através do *software* Octax EyeWare[™] (Universal Imaging Corp., Boston, MA). Os oócitos foram avaliados a 37°C, em gotas de 5 µl de HTF/Hepes+SSS 10%, em placas de Petri revestidas com vidro na parte inferior (MatTek Corp., Ashland, MA), colocadas sobre uma placa aquecida a 37°C. Utilizou-se um número máximo de 7 oócitos em cada placa, sendo o tempo necessário para analisar o fuso celular pela microscopia de polarização e realizar a ICSI inferior ou igual a 7 min.

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 duas a três horas após a captação oocitária e, após esse procedimento, 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 visível foram analisados pela microscopia de polarização e caracterizados quanto ao estágio real de maturação nuclear (TI ou MII), presença ou não de fuso celular visível e localização do fuso celular dos oócitos em MII. Foram considerados em TI os oócitos que apresentavam fuso celular alongado, perpendicular à membrana oocitária, estendendo-se até o primeiro CP. Os fusos celulares em MII foram caracterizados pela presença de fibras birrefringentes distribuídas radialmente, com a forma de barril e orientadas paralelamente à membrana cortical. Como os cromossomos são minimamente birrefringentes, não são adequadamente analisáveis por meio dessa metodologia.

■ Avaliação pós-ICSI, taxas de fertilização, clivagem e qualidade embrionária

Cerca de 18–19 horas após a ICSI, foi avaliada a fertilização, caracterizada pela presença de 2 pró-núcleos e 2 CPs (a taxa de fertilização corresponde ao número de oócitos fertilizados, divididos pelo número de oócitos injetados x 100). Cerca de 24 horas após a ICSI foi realizada a caracterização da presença de clivagem embrionária (a taxa de clivagem corresponde ao número de embriões que sofrem clivagem, ou seja, divisão celular, divididos pelo número total de oócitos fertilizados x 100).

Tabela 1. Análise não invasiva de oócitos maturados *in vivo* obtidos de pacientes inférteis submetidas à injeção intracitoplasmática de espermatozoides

		Maturação Nuclear		Valor p	Fuso		Valor p
		Metáfase II % (n/N)	Telófase I % (n/N)		Não visível % (n/N)	Visível % (n/N)	
Fertilização	Não	22 (110/499)	47 (8/17)	0,03	29,8 (17/57)	21 (93/442)	0,2
	Sim	78 (389/499)	53 (9/17)		70,2 (40/57)	79 (349/442)	
Clivagem	Não	14,1 (55/389)	11,1 (1/9)	0,9	7,5 (3/40)	14,9 (52/349)	0,3
	Sim	85,9 (334/389)	88,9 (8/9)		92,5 (37/40)	85,1 (297/349)	
Embrião 4.1.0	Não	85,6 (286/334)	100 (8/8)	0,6	81,1 (30/37)	86,2 (256/297)	0,5
	Sim	14,4 (48/334)	0		18,9 (7/37)	13,8 (41/297)	

Valor p obtido pelo teste exato de Fischer, nível de significância de 5% $p < 0,05$

Taxa de Fertilização: número de oócitos fertilizados (n)/número de oócitos injetados (N) x 100; taxa de clivagem: número de oócitos clivados (n)/número de oócitos fertilizados (N) x 100; embrião de boa qualidade em D2: número de embrião com 4 células, simétricas e sem fragmentação em D2 (n)/número de oócitos clivados (N) x 100

Cerca de 44–48 horas após a ICSI, D2, foi realizada a análise da qualidade embrionária (quanto ao número e simetria de blastômeros, percentagem de fragmentação e presença ou não de multinucleação). Foram considerados como embriões de boa qualidade no D2 de desenvolvimento os que apresentaram quatro blastômeros, simétricos, sem fragmentação e sem multinucleação.

■ Análise estatística

Os dados foram avaliados com relação à maturação nuclear (percentagens de oócitos em TI e em MII) e de acordo com a visualização ou não do fuso celular (do total de oócitos que estavam em MII) e foram comparados com relação às taxas de fertilização, as taxas de clivagem e a qualidade embrionária em D2. Os dados foram analisados comparativamente através do teste exato de Fisher. Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

O fuso meiótico de 516 oócitos com o primeiro CP extruído foi visualizado através da microscopia de polarização, imediatamente antes da realização da ICSI. Dezesete dos 516 oócitos avaliados estavam em TI (3,3%) e 499 (96,7%) em MII.

Ao se avaliar o grau de maturação nuclear (MII *versus* TI) e compará-lo com os resultados de reprodução assistida, foi observada uma diminuição significativa das taxas de fertilização ($p = 0,03$), considerando o total de oócitos injetados em TI (17 oócitos injetados, sendo 9 fertilizados; taxa de fertilização de 53%) quando comparados ao total de oócitos injetados em MII (499 oócitos injetados, sendo 389 fertilizados; taxa de fertilização de 78%). Não se encontrou diferença significativa entre as taxas de clivagem nos diferentes grupos ($p = 0,9$). Nenhum oócito fertilizado, após injeção em TI, formou embrião de boa qualidade em D2. (Tabela 1).

Ao se comparar os resultados de reprodução assistida entre os oócitos em MII com ou sem fuso celular visível, não foi observada diferença significativa nas taxas de fertilização ($p = 0,2$), clivagem ($p = 0,3$) e no número de embriões de boa qualidade formados em D2 ($p = 0,5$).

Discussão

Oócitos em TI ainda não finalizaram a meiose I, mas podem apresentar, à microscopia óptica, características morfológicas semelhantes a oócitos que completaram a meiose I e estão em MII¹⁰.

As anomalias meióticas podem contribuir para a falência do desenvolvimento celular por meio de diferentes vias, que vão desde a incapacidade do oócito em completar o processo de maturação, tornando-se incapaz de ser fertilizado, até a ocorrência de erros variáveis no processo de maturação meiótica que não impossibilitam a fertilização, mas, contudo, podem comprometer o desenvolvimento embrionário pré- e/ou pós-implantação, bem como a viabilidade futura do conceito²²⁻²⁴. Assim, qualquer alteração no complemento cromossômico, que possa ser originada por uma alteração do fuso meiótico, poderia conduzir a um estado de aneuploidia por não disjunção, junção desbalanceada ou disjunção prematura das cromátides e perda de cromossomos²⁵⁻²⁸, comprometendo o desenvolvimento embrionário.

No presente estudo, observou-se uma diminuição significativa das taxas de fertilização quando foi analisado o total de oócitos maturados *in vivo* que foram injetados em TI quando comparados ao total de oócitos injetados em MII (53 x 78%, respectivamente). Além disso, os oócitos em TI que clivaram não formaram embriões de boa qualidade em D2. Com base nos dados analisados, sugere-se que a utilização de oócitos com o primeiro CP visualizado, em TI (ou seja, que, apesar de aparentemente maduros, não concluíram a meiose I) em procedimentos de reprodução assistida (ICSI), esteja associada a piores

prognósticos relativos ao sucesso gestacional subsequente, relativos tanto a menores taxas de fertilização como formação de embriões de boa qualidade.

Alguns estudos^{3,29} evidenciaram aumento significativo na taxa de fertilização, 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. Esses resultados sugerem que a presença do fuso celular poderia ser um fator de predição para se obter maiores taxas de fertilização, clivagem e de embriões de boa qualidade em D3. Os resultados do presente estudo foram discordantes com os da literatura, pois não se observou

diferença significativa entre as taxas de fertilização, de clivagem e de boa qualidade de embriões quando avaliada a presença ou não de fuso celular visível.

Conclui-se, neste estudo, que é possível que a análise do estágio de maturação nuclear oocitária possa ser utilizada como fator de predição das taxas de fertilização, o que precisa ser analisado em estudos com maiores casuísticas. A sugestão é que se for postergada a inseminação dos oócitos em TI até a conclusão da meiose II, possa ter um melhor resultado dos procedimentos de reprodução assistida, o que precisa ser avaliado por meio de estudo com metodologias pertinentes.

Referências

- Liu L, Oldenbourg R, Trimarchi JR, Keefe DL. A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. *Nat Biotechnol.* 2000;18(2):223-5.
- 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.
- 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.
- Volarcik K, Sheean L, Goldfarb J, Woods L, Abdul-Karim FW, Hunt P. The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. *Hum Reprod.* 1998;13(1):154-60.
- Van Blerkom J, Davis P. Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Hum Reprod.* 2001;16(4):757-64.
- De Santis L, Cino I, Rabellotti E, Calzi F, Persico P, Borini A, et al. Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *Reprod Biomed Online.* 2005;11(1):36-42.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rienzi 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.
- 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, Souza Bonetti TC, Almeida Ferreira Braga DP, Pasqualotto FF, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation. *Fertil Steril.* 2008;90(1):194-8.
- Fang C, Tang M, Li T, Peng WL, Zhou CQ, Zhuang GL, et al. Visualization of meiotic spindle and subsequent embryonic development in in vitro and in vivo matured human oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24(11):547-51.
- Kilani S, Cooke S, Tilia L, Chapman M. Does meiotic spindle normality predict improved blastocyst development, implantation and live birth rates? *Fertil Steril.* 2011;96(2):389-93.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev.* 1992;31(1):63-7.
- Loneragan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1994;37(1):48-53.

24. Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*. 2001;55(6):1303-22.
25. Mandelbaum J, Anastasiou O, Levy R, Guerin JF, Larouziere 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.
26. 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.
27. Van Blerkom J, Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod*. 1992;7(3):379-90.
28. Jones KT, Lane SI. Chromosomal, metabolic, environmental, and hormonal origins of aneuploidy in mammalian oocytes. *Exp Cell Res*. 2012 Feb 24. [Epub ahead of print].
29. Cristina Magli M, 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.