

Claudia Guilhermino Petersen Rodrigues da Costa

*Correlação da maturação e da morfologia
do oócito humano com as características do
fuso meiótico e da zona pelúcida*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia - Área de
Concentração em Obstetrícia e Ginecologia -
Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp , para a
obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. José Gonçalves Franco Júnior

**Botucatu
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Costa, Claudia Guilhermino Petersen Rodrigues da.

Correlação da maturação, dismorfismo e fertilização de oócitos humanos com as características do fuso meiótico e da zona pelúcida / Claudia Guilhermino Petersen Rodrigues da Costa. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: José Gonçalves Franco Júnior

Assunto CAPES: 40101150

1. Reprodução humana 2. Fertilização 3. Inseminação artificial humana

CDD 613.94

Palavras chave: Birrefringência da zona pelúcida; Dismorfismo; Fertilização; Fuso meiótico; Maturação oocitária

A soft, hazy sunset over a calm body of water. The sun is a bright, glowing orb on the horizon, casting a warm, orange-pink light across the sky and reflecting on the water's surface. In the foreground, the dark, silhouetted rocks of an island are visible on the left. The overall atmosphere is peaceful and contemplative.

Nada como a lua para me fazer sonhar...

Nada como o sol para me iluminar...

Nada como o vento para me acariciar

Nada como o mar para me acalmar..

Nada como a noite para me aconchegar...

Nada como dia para me alegrar...

Nada como o estudo para me orientar...

A ti vida, eu agradeço.

Claudia Petersen

Dedicatórias



Aos meus pais, Álvaro e Gláucia,

Pela demonstração de luta e determinação diante as dificuldades.

Pela demonstração de beleza em cada ato de suas vidas.

Pela oportunidade de meus estudos.

Pelo amor e confiança.

Por me ensinarem a agradecer.

As minhas filhas, Bruna e Letícia.

Pela companhia sempre presente.

Pela festa em seus olhares a cada encontro nosso.

Por serem os “diamantes” de minha vida.

Pela alegria e razão do meu viver.

Aos meus irmãos, Álvaro Jr, Alexandre, Gláucia, Marcelo e André.

Por tantos momentos gostosos, alegres, saudáveis e inesquecíveis

E, especialmente, ao Júnior, pela constante presença.

Aos meus “anjos” da guarda, Vó Minda e tio Jeremias.

Nada é mais forte em mim do que a certeza de suas “eternas” companhias.

As minhas cunhadas Beth, Cris e Renata e ao meu cunhado Tico.

Pelas palavras positivas e animadoras.

A minha querida amiga, Odalga.

Pelos conselhos sinceros e importantes em minha vida.

Pela constante disposição em me auxiliar.

Pela oportunidade de tê-la em meu caminho.

A minha companheira de trabalho há tantos anos, Ana Lucia Mauri, meu eterno agradecimento pelos momentos de atenção e gentilezas. São nos momentos de dificuldade é que conhecemos os verdadeiros amigos. Obrigada pelo apoio profissional e pessoal durante todo o desenvolvimento desta tese.

Homenagem



Ao Prof. Dr José Gonçalves Franco Jr

Obrigada pela paciência, disponibilidade e demonstração de confiança, jamais esquecerei de suas atitudes durante tantos anos de trabalho: honestidade, educação, luta, confiança, perseverança, gentileza e força interior.

Obrigada pela sua orientação e ensinamentos preciosos para o meu desenvolver profissional, eu realmente tive um orientador.

Ao professor, minha gratidão...

Agradecimentos



Ao meu orientador Prof Franco Jr, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo apoio e pela sua grande disponibilidade.

Ao Dr Ricardo Baruffi pelos anos juntos de trabalho, especialmente por promover momentos alegres e de otimismo.

Ao Dr João Batista Alcântara Oliveira pelos ensinamentos de paciência, perseverança e eficácia.

Aos médicos Dr Eduardo Vila Boas, Dr João Cornicelli e Dra Paula Contart por ajudarem de maneiras diversas durante o percorrer deste caminho.

As biomédicas Fabiana Massaro e Liliane Silva, companheiras de trabalho, pela coleta de dados e atenção no laboratório.

As enfermeiras Valéria, Juliana e Andreia meus sinceros agradecimentos pela dedicação e paciência.

As auxiliares de enfermagem Daniela, Vanessa e Elisângela, pelo bom dia de todo dia.

A Laura Diniz Vagnini pela atenção e eficiência nas realizações dos procedimentos de maturação citoplasmática.

A Elisângela Vigil, eficaz secretária, pela contribuição na configuração das figuras e documentação.

A todos os funcionários da limpeza, manutenção e segurança pelo agradável ambiente de trabalho.

Aos funcionários da seção de pós-graduação e da biblioteca da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, por serem tão prestativos e me atenderem com tanta gentileza, especialmente à Janete, Regina e Meire.

A querida Anice Martins, pela amável ajuda em diferentes momentos.

A Sra Leda Martins pela correção do português.

Finalmente, as vocês pacientes que buscam a essência da vida, a reprodução, e nos permitem a oportunidade de trabalhar.

Sumário



CAPÍTULO I**Correlação da maturação, dismorfismo e fertilização de oócitos humanos com as características do fuso meiótico e da zona pelúcida**

14

LISTA DE TABELAS..... 15**LISTA DE FIGURAS** 17**ABREVIATURAS** 19**RESUMO** 21**SUMMARY** 23**1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA** 24

1.1. Maturação oocitária 26

1.1.1 Maturação nuclear (MN)..... 27

1.1.2 Maturação citoplasmática (MC)..... 28

1.2 Dismorfismo oocitário..... 29

1.3 Fertilização..... 32

1.3.1 Capacitação, reação acrossômica e a fusão do espermatozóide 32

1.3.2 Ativação oocitária 33

1.3.3 Reação cortical..... 34

1.3.4 Fusão dos pronúcleos 34

1.4 Fuso meiótico (FM)..... 35

1.5 Zona Pelúcida (ZP)..... 37

2. OBJETIVO 41**3. MATERIAL E MÉTODOS** 42

3.1 População..... 42

3.2 Estimulação Ovariana..... 43

3.3 Coleta e Identificação dos Oócitos..... 43

3.3.1 Desnudação oocitária 44

3.3.2 Classificação da maturidade nuclear..... 46

3.4 Maturação Nuclear (Experimento 1)..... 49

3.4.1 Cultura dos oócitos imaturos..... 50

3.5 Maturação Citoplasmática (Experimento 2)..... 61

3.5.1 Coloração da cromatina e dos GC..... 62

3.6 Dismorfismo Oocitário (Experimento 3)..... 65

3.7 Fertilização Oocitária (Experimento 4)..... 71

3.8 Análise Estatística..... 72

4. RESULTADOS	73
4.1 Maturação Nuclear.....	73
4.1.1 Maturação nuclear versus fuso meiótico	73
4.1.2 Maturação nuclear versus características da zona pelúcida.....	74
4.2 Maturação Citoplasmática.....	75
4.2.1 Maturação citoplasmática versus fuso meiótico.....	76
4.2.2 Maturação citoplasmática versus características da zona pelúcida	77
4.3 Dismorfismo Oocitário.....	78
4.3.1 Dismorfismo versus fuso meiótico	79
4.3.2 Dismorfismo versus características da zona pelúcida	79
4.4 Fertilização.....	81
4.4.1 Fertilização versus fuso meiótico.....	81
4.4.2 Fertilização versus características da zona pelúcida.....	82
5. DISCUSSÃO	85
6. CONCLUSÕES	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

CAPÍTULO II

Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcomes: a meta-analysis	112
--	------------

1-ABSTRACT	114
2-INTRODUCTION	115
3-MATERIALS AND METHODS	117
4-RESULTS	125
5-DISCUSSION	128
6-REFERENCE	135
ANEXOS	148

Capítulo 9

*Correlação da maturação, dismorfismo
e fertilização de oócitos humanos
com as características do fuso
meiótico e da zona pelúcida*



LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Horários de avaliação da maturação nuclear.....	50
Tabela 2 -	Características gerais da população que participou do experimento de maturação nuclear.....	73
Tabela 3 -	Correlação da maturação nuclear (VG, MI, MII) com a birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP).....	74
Tabela 4 -	Espessura total da zona pelúcida em oócitos no estágio de vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI) e metáfase II (MII), durante a maturação nuclear.....	75
Tabela 5 -	Características gerais da população que participou do experimento de maturação citoplasmática.....	76
Tabela 6 -	Correlação da maturação citoplasmática (MC) com a presença ou ausência do fuso meiótico (FM).....	76
Tabela 7 -	Correlação da maturação citoplasmática (MC) com a birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP).....	77
Tabela 8 -	Espessura total da zona pelúcida (Esp-ZP) e variação da espessura da zona pelúcida (VZP) em oócitos com presença e ausência de maturação citoplasmática (MC).....	78
Tabela 9 -	Características gerais da população que participou do experimento de dismorfismo oocitário.....	78
Tabela 10 -	Correlação das anomalias intracitoplasmáticas (AIC) com a presença ou ausência do fuso meiótico (FM).....	79
Tabela 11 -	Correlação das anomalias intracitoplasmáticas (AIC) com a birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP).....	80
Tabela 12 -	Espessura total da zona pelúcida (esp-ZP) em oócitos com presença ou ausência de anomalias intracitoplasmáticas (AIC).....	80

Tabela 13 -	Características gerais da população em que a fertilização foi avaliada.....	81
Tabela 14 -	Correlação da fertilização com a presença ou ausência do fuso meiótico (FM).....	82
Tabela 15 -	Correlação da fertilização com birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP).....	82
Tabela 16 -	Espessura da zona pelúcida (esp-ZP) em oócitos com presença ou ausência de fertilização.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sistema para a desnudação oocitária.....	45
Figura 2 -	Oócito imaturo (Prófase I).....	47
Figura 3 -	Oócito intermediário (Metáfase I).....	48
Figura 4 -	Oócito maduro (Metáfase II).....	49
Figura 5 -	Sistema de cultura por microgota.....	51
Figura 6 -	Microscópio invertido Nikon com sistema de luz polarizada.....	52
Figura 7 -	Filtro circular polarizador.....	53
Figura 8 -	Objetiva 25 x - OCTAX	53
Figura 9 -	Cristal líquido	54
Figura 10 -	Câmera de imagens.....	54
Figura 11 -	Sistema de imagem - OCTAX Eyeware TM	55
Figura 12 -	Platina aquecedora Tokai	55
Figura 13 -	Oócito em metáfase II com fuso meiótico presente.....	57
Figura 14 -	Oócito em metáfase II com ausência de fuso meiótico..	57
Figura 15 -	Programa de avaliação da birrefringência da ZP- OCTAX EyeWare polarAIDE.....	58
Figura 16 -	Imagem de um oócito com BF-ZP positiva.....	59
Figura 17 -	Imagem de um oócito com BF-ZP negativa.....	60
Figura 18 -	Medidas da espessura da zona pelúcida (μm) em quatro posições (norte,sul,leste e oeste).....	61

Figura 19 –	Oócito em estágio de MII, com maturação citoplasmática completa (GC dispostos na periferia)....	63
Figura 20 –	Oócito em estágio de MII, com ausência de maturação citoplasmática (GC dispostos na periferia e no centro).	64
Figura 21 -	Microscópio de luz convencional Nikon.....	65
Figura 22 –	Oócito em MII com granulações no centro do citoplasma.....	66
Figura 23a –	Oócito em MII com granulações na lateral do citoplasma.....	67
Figura 23b –	Oócito MII com granulações em todo o citoplasma.....	67
Figura 24 a,b –	Oócito em MII com presença de corpos refratários no citoplasma.....	68
Figura 25 –	Oócito em MII com presença de agregados de retículo endoplasmático.....	69
Figura 26 a,b –	Oócito com vacúolos no citoplasma.....	70
Figura 27 –	Oócito em estágio MII com fertilização normal presente (presença de 2PN no citoplasma).....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC-	Anomalias extracitoplasmáticas
AIC -	Anomalias intracitoplasmáticas
ATP -	Adenosina trifosfato
BF-ZP -	Birrefringência da zona pelúcida
CP -	Corpúsculo polar
CONEP-	Comissão nacional de ética em pesquisa
EPV -	Espaço perivitelínico
Esp-ZP -	Espessura total da Zona pelúcida
ESO-	Escore de seleção oocitária
FM -	Fuso meiótico
FPM -	Fator de promoção da maturação
FIV -	Fertilização “in vitro”
FSH -	Hormônio folículo estimulante
GC -	Grânulos corticais
HSA -	Soro albumina humana
ICSI -	Injeção intracitoplasmática de espermatozóide
MC -	Maturação citoplasmática
mHTF -	Meio tubário humano modificado
MN -	Maturação nuclear
MI -	Metáfase I
MII -	Metáfase II

PBS –	Tampão salino fosfato
PN -	Pronúcleo
RA -	Reprodução Assistida
RE -	Retículo endoplasmático
rhCG-	Hormônio gonadotrófico coriônico recombinante
SB -	Solução de bloqueio
UI –	Unidade internacional
VG -	Vesícula germinativa
VZP -	Variação da espessura da zona pelúcida
ZP -	Zona pelúcida

RESUMO

Nas últimas décadas, alguns parâmetros laboratoriais têm sido propostos para identificar o potencial de saúde oocitária em Reprodução Assistida: 1. Maturidade nuclear e citoplasmática (pesquisa); 2. Dismorfismo (anomalias intracitoplasmáticas); 3. Fertilização. Habitualmente, esses parâmetros (exceto a maturação citoplasmática) são avaliados pelo simples emprego de sistemas de microscopia de luz convencional. Nos últimos oito anos, foram relatados diversos estudos em oócitos humanos sobre a birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP), a espessura da ZP, e a visualização do fuso meiótico (FM). Entretanto, ainda é discutível o poder desses novos parâmetros na seleção de óvulos com o potencial de originar embriões com taxas de implantação elevadas, além disso, seu sistema de visualização e quantificação é complexo e dispendioso. O objetivo deste estudo foi investigar uma possível correlação entre esses parâmetros tradicionais com a BF-ZP, espessura da ZP e o FM. Dessa forma, um total de 73 pacientes que participaram do programa de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) no Centro de Reprodução Humana “Prof Franco Júnior” tiveram seus óvulos avaliados quanto a maturação nuclear (n=83), maturação citoplasmática (n=29), dismorfismo (n=280) e fertilização (n=216) sendo os resultados correlacionados com a imagem do FM (presença ou ausência), a intensidade da BF-ZP (positiva ou negativa) e a espessura da ZP. Os dados finais revelaram uma fraca correlação entre a maturação, o dismorfismo e a fertilização oocitária com a imagem do FM, a intensidade da BF-ZP, e a espessura da ZP.

Entretanto, esses parâmetros poderiam ser responsáveis por identificar pontos biológicos diferentes do potencial de qualidade oocitária. Assim sendo, seria uma medida coerente, a utilização desses parâmetros, em forma conjunta, através de um escore de qualidade oocitária.

SUMMARY

During the last decades, three laboratorial parameters have been proposed to identify the potential of the oocyte quality in ART: 1- Nuclear and cytoplasmic maturation; 2-Dysmorphisms (intracytoplasmic abnormalities); 3 - Fertilization. These parameters (except the cytoplasmic maturation) are assessed by a simple system of conventional light microscopy. In the last eight years, numerous studies about zona pellucida birefringence (BF-ZP), zona pellucida thickness and meiotic spindle visualization have been reported. However, it is still controversial the power of these parameters in selecting oocyte with potential to develop into implantation-competent embryos. Furthermore, the microscopy system is complex and expensive. The present study aims to evaluate whether there is any correlation between the classical parameters with BF-ZP, ZP thickness and spindle image. A total of 73 patients who participated in an ICSI program had their oocytes evaluated such nuclear maturation (n=83), cytoplasmic maturation (n=29), dysmorphism (n=280) and fertilization (n=216) being its results correlated to the spindle image (presence or absence), BF-ZP intensity (positive or negative) and ZP thickness. The final results showed a low correlation between maturation, dysmorphism and fertilization compared to spindle image and ZP characteristics (BF-ZP, ZP thickness). However, these factors can be responsible to identify specific biological differ from the oocyte potential. Concluding, the use of these factors in association, as a score (oocyte quality score), could be the correct evaluation.

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A identificação de um critério para qualificar o potencial de um oócito antes da fertilização é uma das áreas investigadas no campo da reprodução assistida (RA). Basicamente, três parâmetros clássicos laboratoriais têm sido propostos na literatura para qualificar os oócitos: 1- A avaliação da maturidade do oócito, ou seja, a classificação do estágio de maturação oocitária (prófase I, metáfase I e II) (parâmetro direto); 2- A avaliação das características morfológicas extra (AEC) e intracitoplasmáticas (AIC), tais como: forma, cor, granularidade e homogeneidade do citoplasma, tamanho e debris do espaço perivitelínico, vacuolização, inclusões e anomalias do primeiro corpúsculo polar (CP) e da zona pelúcida (parâmetros direto) 3- A avaliação da capacidade do oócito fertilizar após inseminação do espermatozóide (parâmetro indireto). Tais investigações têm sido realizadas através do emprego de microscopia de luz convencional.

Entretando, com a introdução da microscopia de luz polarizada ¹ foi possível a visualização “in vivo” da imagem da estrutura multilaminar da zona pelúcida (ZP) ² e do fuso meiótico (FM) ³ em oócitos de Hamster. Tal fato atraiu a atenção dos pesquisadores da área de RA para estudar esses novos parâmetros em oócitos humanos. Nos últimos oito anos, a avaliação da birrefringência da ZP (BF-ZP) e a visualização do FM em oócitos humanos têm sido propostas como variável preditiva da qualidade oocitária ^{4 - 13}. Contudo, o poder desses novos parâmetros não invasivos para predizer a qualidade dos óvulos ainda é discutível.

O presente estudo foi planejado para analisar a correlação entre os três fatores clássicos: maturação (nuclear e citoplasmática), dismorfismo e a fertilização dos oócitos humanos com os recentes parâmetros propostos na literatura: a avaliação da BF-ZP e do FM.

Em RA, a seleção dos gametas tem como principal objetivo alcançar melhores taxas de gestação, sendo tarefa essencial no dia a dia dos embriologistas. Por outro lado, esta questão também tem particular relevância quando, por considerações éticas e/ou legais, limita-se o número de óvulos a serem fertilizados, e, conseqüentemente, o número produzido de embriões supranumerários. Dessa forma, seria importante identificar os marcadores da qualidade oocitária para a obtenção de melhores embriões, e, posteriormente, maiores taxas de implantação embrionária e de gravidez ^{14,15}. As características de saúde oocitária são adquiridas durante a foliculogênese, do processo de crescimento até a maturação folicular; seu estudo identifica uma nova área de pesquisa em RA: a seleção de gametas.

1.1. MATURAÇÃO OOCITÁRIA

A maturação oocitária é a terceira fase da oogênese, em que várias mudanças ocorrem dentro do oócito, preparando-o para a ovulação e sua iminente interação com o espermatozóide. Este é um processo complexo que envolve eventos nucleares, meióticos e citoplasmáticos. Para que o estágio final tenha um ótimo desenvolvimento oocitário, antes da ovulação, é necessária uma sincronização entre a maturação nuclear (MN) e a citoplasmática.

1.1.1 Maturação nuclear (MN)

Durante o período de crescimento folicular, os oócitos apresentam os cromossomos difusos, porém envolvidos por uma membrana nuclear intacta, denominada vesícula germinativa (VG). A célula apresenta-se bloqueada na fase G2 do ciclo da divisão celular, ou seja, retida na prófase I da primeira divisão meiótica por um período longo, variando de dias a décadas dependendo da espécie. A MN envolve o processo de transição da fase G2 para a fase M (metáfase). Esta transição é caracterizada por vários fenômenos: a condensação da cromatina, a quebra da membrana nuclear resultando na mistura do nucleoplasma com o citoplasma, a formação do FM e a segregação dos cromossomos. Nesta fase, os cromossomos presentes no citoplasma migram para a periferia ocorrendo a retomada da meiose via extrusão da metade dos cromossomos para o primeiro CP. O ciclo meiótico é bloqueado, pela segunda vez, de forma que o oócito, então, apresenta-se na fase de metáfase II (MII) caracterizada pela presença do primeiro CP.

Apesar da conclusão das mudanças nucleares para a produção de oócitos em MII, esta não define sua competência e não reflete a maturidade molecular e estrutural do oócito. Um oócito, que não completou a maturação citoplasmática (MC), é de pobre qualidade e incapaz de atingir seu desenvolvimento com pleno sucesso.

1.1.2 Maturação citoplasmática (MC)

A maturação de um óvulo não envolve apenas a MN, mas uma variedade de outros processos que ocorrem dentro do citoplasma responsáveis pela preparação do oócito para sua ativação e uma adequada fertilização. Tais processos incluem mudanças estruturais e bioquímicas. As mudanças estruturais do citoplasma são, basicamente, caracterizadas pela reorganização das organelas citoplasmáticas definidas como o aumento no número e na mudança da morfologia das mitocôndrias; modificações ultra-estruturais do complexo de Golgi (acúmulo de ribossomos); alterações no sistema de transporte das membranas devido à ligação de vesículas (grânulos glicogênicos) na membrana; estabelecimento da polaridade do oócito responsável pela determinação dos eixos do embrião.

Em relação aos eventos moleculares, duas proteínas: a ciclina B e a p34 são responsáveis pela progressão da fase G2 para M. Ambas estão associadas e formam o fator de promoção da maturação (FPM) depois da desfosforilação da p34. A ativação do FPM desencadeia a quebra da VG do oócito, a condensação dos cromossomos, e, conseqüentemente, a formação em estágio de MII.

É sabido que uma MC insuficiente é responsável pela falha na formação do PN masculino, podendo aumentar as anomalias cromossômicas após a fertilização. Em adição, uma deficiência na MC ou a assincronia da MN e MC tem sido relacionada com a formação de oócitos morfologicamente anormais,

visíveis na convencional microscopia de luz ¹⁶. Por outro lado, a ocorrência de anomalias morfológicas (AEC e/ou AIC) nos oócitos é chamada de dismorfismo oocitário estando associada a defeitos intrínsecos que influenciam negativamente na competência do oócito ^{17,18}.

1.2 DISMORFISMO OOCITÁRIO

O oócito, em estágio de MII, aparentemente normal quanto à organização AEC e AIC (oócito de “boa qualidade morfológica”) é definido como o oócito que apresenta: uma forma esférica, um único e intacto CP, pequeno espaço perivitelínico (EPV), ZP clara, citoplasma transparente com homogênea coloração e sem inclusões. Entretanto, muitos dos oócitos em MII exibem um grande número de anomalias que podem ser divididas em dois grupos: anormalidades AEC, representada por 71 % das anomalias, e as AIC que incluem 19% destas ¹⁹.

As AEC são caracterizadas pela presença de anormalidades na forma (diferente da esférica), no EPV (tamanho: largo/estrito, grânulos), na ZP (estrutura: espessa/fina, coloração), e/ou no primeiro CP (fragmentado/degenerado), enquanto que as AIC são identificadas pela presença de granulações (homogêneas/heterogêneas) e/ou inclusões (corpos refráteis/vacúolos/agregados do retículo endoplasmático (RE)) no citoplasma.

Van Blerkom e Henry ¹⁷ demonstraram que 13% dos oócitos não fertilizados após a fertilização “in vitro” (FIV) apresentaram dismorfismo oocitário. Posteriormente, quando as células do cúmulus foram retiradas para a realização da ICSI, 60 a 70% do oócitos tinham anomalias morfológicas.

As prováveis causas do dismorfismo oocitário têm sido associadas com a estimulação ovariana, o ambiente hormonal em que o gameta é exposto, a constituição do próprio oócito ²⁰ e as condições de cultura e nutrição nas quais esses oócitos são submetidos ¹⁹.

Além disso, o dismorfismo oocitário tem sido relacionado às taxas de fertilização e clivagem, ao desenvolvimento embrionário e à implantação embrionária ^{21,22,19,23,24}.

Até o momento, diversos trabalhos têm mostrado conflitantes conclusões com relação ao impacto da morfologia oocitária nos resultados de RA.

Embora o efeito da AEC ainda seja controverso no que diz respeito às anomalias associadas com a morfologia do primeiro CP, EPV e ZP, poucos estudos têm demonstrado que tais anomalias afetam a implantação.

Por outro lado, em relação às AIC, existe um consenso nos estudos descritos na literatura. A presença de granulações, especialmente na região central, e a identificação de inclusões (vacúolos e agregados do RE) no citoplasma parecem estar associadas com fertilização, desenvolvimento e implantação embrionária.

Segundo Kahraman *et al.*²⁵, as granulosidades, no centro do citoplasma, representam um sinal de imaturidade oocitária. Os autores demonstraram que a transferência de embriões derivados de oócitos com granulações centrais escuras diminuiria significativamente as taxas de implantação e gravidez. Em adição, Khalili *et al.*²⁶ afirmaram que a presença de grânulos no citoplasma foi a principal anormalidade observada em oócitos não fertilizados. Além disso, vacúolos também podem surgir pela fusão de vesículas pré-existentes derivadas de RE do complexo de Golgi²⁷. Em prévios trabalhos, observou-se que a incidência de vacúolos em oócitos no estágio de MII variou de 5.7%²⁸ a 12.4%²⁹. A presença de um ou mais vacúolos no citoplasma diminuiu significativamente o número de zigotos após ICSI versus o controle não afetado^{28,27}. Em teoria, largos e/ou múltiplos vacúolos causariam maiores efeitos no oócito quando comparados com pequenos vacúolos. Van Blerkom³⁰ demonstrou que grandes vacúolos deslocam o fuso meiótico de sua posição podendo resultar em falha de fertilização. O autor ainda reportou que, se a fertilização for presente em oócitos com grandes vacúolos, os zigotos podem falhar na primeira divisão ou exibir um padrão anormal de citocinese.

Por outro lado, a presença de agregados de RE no citoplasma também tem demonstrado prejudicar significativamente a qualidade embrionária, afetando as taxas de gravidez³¹. Meriano *et al.*³² observaram que a presença repetitiva dessas estruturas em ciclos consecutivos é indicativa de baixas taxas de implantação e gravidez.

Em adição, oócitos em estágio de MII que exibem severa desorganização citoplasmática têm um pH e conteúdo de ATP menor e uma aumentada incidência de aneuploidia^{33,34}.

1.3 FERTILIZAÇÃO

A fertilização é um complexo processo de interação entre células, que se inicia pelo reconhecimento e a ligação do espermatozóide ao oócito e termina na fusão dos PN masculino e feminino. Este fato abrange a capacitação, a reação acrossômica, a fusão do espermatozóide, a ativação oocitária, a reação cortical, e, finalmente, a fusão dos pronúcleos (PN).

1.3.1 Capacitação, reação acrossômica e a fusão do espermatozóide

A capacitação parece envolver tanto uma alteração na composição lipídica e glicoprotéica da membrana plasmática do espermatozóide como um aumento no seu metabolismo e motilidade. O processo de capacitação depende de alterações da permeabilidade da membrana ligadas ao transporte dos íons Ca^{++} . A modulação do íon cálcio é fundamental para os espermatozoides adquirirem a capacidade de fertilização, tendo esse processo três aspectos fundamentais: 1 - a presença de ATP capaz de bombear o íon Ca^{++} para fora da célula; 2 - o processo de troca de íons Ca^{++} (exterior) com Na^{+} para o interior; 3- canais de cálcio que facilitariam a rapidez de fluxo. Uma vez que o espermatozóide capacitado tenha penetrado na camada de células foliculares, liga-se à ZP que funciona como uma barreira à fertilização entre espécies. A ZP de óvulos de mamíferos é composta por três glicoproteínas. Duas delas, ZP2 e

ZP3, agrupam-se em filamentos, enquanto a terceira, ZP1, faz a ligação cruzada dos filamentos formando uma rede tridimensional. Nesta ligação, o espermatozóide é induzido a sofrer reação acrossômica, na qual o conteúdo do acrossomo é liberado por exocitose. Tal reação libera proteases e hialuronidase essenciais para a penetração do espermatozóide através da ZP. Em adição, a reação acrossômica expõe uma proteína da membrana plasmática do espermatozóide que medeia a união e a fusão desta membrana à do óvulo.

1.3.2 Ativação oocitária

A ativação oocitária é definida como uma série de eventos morfológicos e bioquímicos ocorridos após a fusão do espermatozóide e que levarão à divisão e à diferenciação celular para formar um novo indivíduo. Quando o espermatozóide funde-se com a membrana plasmática do óvulo, ativa a via de sinalização celular do inositol-fosfolipídio do óvulo. Esta, por sua vez, causa um aumento local de íons Ca^{++} no citosol, que se distribui em ondas por toda a célula. O aumento dos íons Ca^{++} no citosol parece ativar o óvulo e iniciar a reação cortical, onde os grânulos corticais (GC) liberam seu conteúdo por exocitose.

1.3.3 Reação cortical

No citoplasma, originado do aparelho de Golgi, detectam-se numerosas e pequenas partículas, GC, menores que 2μ , os quais, a partir do cone de fertilização, concentram-se nas proximidades da ZP, passando, então, a se dissolverem no citoplasma. A exocitose de grânulos citoplasmáticos é um dos sinais mais precoces de que houve ativação ovular. Acredita-se que a ligação do espermatozóide à superfície ovular altere a condutância da oolema a íons cálcio. Com o influxo de cálcio e aumento nas concentrações intracelulares desse íon, ocorre a exocitose dos GC para o EPV. Por outro lado, com o influxo de cálcio, teriam início os movimentos cromossômicos para a anáfase II e a descondensação do núcleo espermático para formar os PN.

1.3.4 Fusão dos pronúcleos

O óvulo bloqueado na metáfase da segunda divisão meiótica, quando fecundado, retoma o processo divisional formando o PN oocitário (haplóide) e eliminando o segundo CP. O núcleo espermático descondensa-se, dando origem ao PN espermático. A síntese de DNA (duplicação cromossômica) começa em ambos os PN. Estes se aproximam no centro do citoplasma. As membranas plasmáticas pronucleares se desintegram e os cromossomos se misturam finalizando a fase de fertilização.

O intervalo entre a fusão do espermatozóide com o óvulo e a observação da primeira clivagem embrionária leva em torno de 12 horas na espécie humana e varia de espécie para espécie.

Os PN são formações elípticas e simétricas, sendo que a distância entre os dois varia em função do tempo decorrido desde a fertilização. Inicialmente, estão afastados e, progressivamente, aproximam-se até a fusão.

O processo de fertilização normal compreende a presença de dois PN: um feminino e outro masculino; e a presença do primeiro e segundo CP. Mais de dois PN implica penetração polispérmica ou retenção do segundo CP no oócito.

Apesar do contínuo desenvolvimento das técnicas de RA, o uso da técnica de ICSI ultrapassa tais eventos. Mesmo assim, a falha da fertilização ainda ocorre nos oócitos. De fato, após a ICSI, 30% dos oócitos falham em fertilizar^{35,36}, sendo que em 2 a 3 % dos casos pode ocorrer a falha total de fertilização dos oócitos³⁷.

1.4 FUSO MEIÓTICO (FM)

O FM, composto de microtúbulos do citoesqueleto, desempenha um papel principal no sucesso do processo da meiose pelo controle do movimento cromossômico através dos vários estágios. Diferentes autores sugeriram que a desorganização do FM leva à disrupção da segregação cromossômica ordenada resultando em aneuploidia dos zigotos^{38,39}.

Por outro lado, a morfologia e a cinética do FM são influenciadas por variáveis, tais como: idade, temperatura e manipulação “in vitro” dos oócitos. Battaglia *et al.*⁴⁰ indicaram que a incidência de anormalidade do FM em oócitos era significativamente maior em mulheres mais idosas. Posteriormente, Volarcik *et al.*⁴¹ confirmaram essa associação estudando o efeito da idade sobre o processo meiótico de oócitos maturados “in vitro” vindo de ovários não estimulados. Este efeito sobre o FM correlaciona-se também com a alta incidência de erros de segregação meiótica observada com o aumento da idade da mulher.

A temperatura, sem dúvida, é um importante parâmetro que afeta a integridade do FM durante a manipulação “in vitro”. Os FM em oócitos humanos são mais sensíveis a flutuações de temperatura quando comparados com outros animais⁴²⁻⁴⁴. Os FM desagregados podem resultar de prolongada exposição a temperaturas baixas^{4,45}. Sun *et al.*⁴⁶, analisando oócitos maturados “in vitro”, relataram que fusos em oócitos humanos são também sensíveis a temperaturas maiores que 37°C. Estes resultados indicam que, quando os oócitos humanos são manipulados “in vitro”, um controle rigoroso da temperatura a 37°C é essencial para a manutenção da integridade do FM e posterior desenvolvimento embrionário adequado.

Variações no comprimento do FM foram relatadas por Wang *et al.*⁴. A idade da mulher^{47,48,16} e a exposição a diferentes condições de cultura são fatores implicados como fontes potenciais para determinar o comprimento do FM. Shen *et al.*⁴⁹ relataram que a média do comprimento dos fusos de todos os oócitos são

similares em diferentes coortes. Entretanto, Rama Raju *et al.*¹¹ observaram que os embriões resultantes de oócitos com comprimento do FM >12nm mostraram, significativamente, mais progressão ao estágio de blastocisto. Também foi observado que o comprimento do FM diminui com o aumento da idade da mulher.

1.5 ZONA PELÚCIDA (ZP)

A ZP é um invólucro glicoprotéico que rodeia os oócitos em crescimento e os maduros, assim como, os embriões pré-implantados dos mamíferos⁵⁰⁻⁵⁵. As glicoproteínas da zona ZP aparentemente são secretadas pelo oócito durante a foliculogênese, como mostradas em experimentos com camundongos^{56,57}. Por outro lado, há evidência em outras espécies, inclusive em humanos, de que as células da granulosa também contribuem para a expressão das proteínas da zona durante a foliculogênese⁵⁸⁻⁶⁰. Avaliando o nível ultra-estrutural, a arquitetura filamentar tridimensional altamente ordenada da ZP foi confirmada por estudos em oócitos de mamíferos, incluindo oócitos humanos^{61,52,63,64}. A ZP dos oócitos humanos exprime quatro proteínas (ZP1, ZP2, ZP3 e ZP4), que modificam a conformação depois da extrusão de GC na fertilização, como ocorre em camundongo⁶⁵⁻⁶⁷. Com relação ao nível molecular, a ZP compõe-se de uma estrutura de rede paracristalina, tridimensional, composta de filamentos heterodiméricos de proteína ZP2 e proteína ZP3, ligados pela proteína ZP1^{68,69,63}.

O significado funcional da distribuição variável e não aleatória das diferentes proteínas glicosiladas dentro das camadas da zona pelúcida é ainda desconhecido^{59,70}. Outra proteína da ZP humana (ZPB) pode contribuir de modo ainda desconhecido a interações espermatoócito espécie-específica na fertilização humana⁷¹. As proteínas da ZP formam uma espessa matriz extracelular separando fisicamente os oócitos dos mamíferos das células da granulosa. Entretanto, é essencial que a ZP seja atravessada por projeções citoplasmáticas de arranjo radial transzonal durante o crescimento e maturação do oócito. Elas provêm às condições para ligação juncional direta, sinalização célula-célula e a troca de moléculas entre o oócito e o compartimento somático^{72,73}, importantes para o crescimento do oócito^{74,75}. Dentro da ZP, as projeções podem formar uma rede hexagonal junto com as fibrilas da zona, e, então, contribuem para a organização tridimensional do espaço extracelular^{72,73,76}. A proteína ZP1 é necessária para a integridade estrutural da zona pelúcida^{77,63}. Embora oócitos de rato desprovidos do gene ZP1 ainda secretem proteínas ZP2 e ZP3, a ZP é mais fina e frouxamente organizada, em comparação ao padrão normal. O diâmetro dos oócitos de animais homozigóticos para a ausência do gene da ZP1 é quase a metade dos oócitos advindos de animais normais⁷⁸. Isto sugere que a sinalização efetiva das células da granulosa-oócito deve depender da presença de uma zona funcional e altamente estruturada e que alterações podem causar subfertilidade. Além disso, redução na expressão das proteínas da ZP durante o crescimento do oócito pode indicar problemas no processo de maturação em uma fase crítica da oogênese e folículo gênese, quando oócitos adquirem total competência nuclear e de desenvolvimento. A ZP é

também essencial para a fertilização⁷⁹ e o desenvolvimento pré-implantacional “in vivo”, agindo na ligação táxon-específica do espermatozóide⁸⁰⁻⁸², previne poliespermia^{83,84} e protege o embrião do estresse mecânico antes da implantação⁵⁴. Dessa forma, defeitos na zona pelúcida estão usualmente associados com problemas na fertilização ou anormalidades de desenvolvimento. Por exemplo, camundongos desprovidos de genes ZP2 e ZP3 são incapazes de formar a ZP e são estéreis⁸⁵⁻⁸⁶. Até o momento, foram identificados somente uns poucos marcadores não invasivos para a qualidade dos oócitos baseados em critérios morfológicos, os quais podem ser acessados em RA pelo uso da microscopia convencional antes da inseminação¹⁵. Com relação a esse aspecto, a microscopia de luz polarizada (Polscope) foi um grande avanço, desde que se tornaram possíveis as análises não invasivas dos FM em oócitos humanos¹. A microscopia de luz polarizada usa o princípio de que a luz, passando através de objetos cristalinos ou paracristalinos, será alterada como no plano ou fase de vibração. O método pode, então, ser usado para acessar estruturas cristalinas e paracristalinas quantitativa e qualitativamente. Por exemplo, a magnitude da birrefringência da luz polarizada é um indicador para densidade, alinhamento ou espessura de um objeto.

Os primeiros trabalhos sobre o FM forneceram informações extensas sobre sua função na divisão celular. Entretanto, como a metodologia para visualização do FM era baseada em processo de fixação do oócito, sua aplicação rotineira em procedimentos de RA, e em estudos dinâmicos, era frustrada devido à impossibilidade do emprego deste método em oócitos vivos^{87,4,39,21,22,11}.

Recentemente, com o uso do microscópio de luz polarizada e um software com processador para integração de imagens, tem sido possível visualizar o FM, em oócitos vivos, de forma não invasiva, preservando a viabilidade celular^{87,4,5,88,6,8,89,23,90-92,11}; assim como, as subestruturas da ZP de mamíferos^{2,4,39}. A microscopia de polarização permite a distinção de três camadas da ZP de oócitos humanos. A camada interna exibe a maior intensidade de birrefringência⁹³. Em um estudo retrospectivo, Shen et al⁹ observou que a birrefringência da camada interna da ZP era diferente em ciclos com concepção comparados com os ciclos sem concepção. Os embriões transferidos nos ciclos com concepção eram derivados de oócitos com alta/positiva birrefringência da ZP (BF-ZP). Recentemente, Rama Raju et al¹¹ demonstrou uma positiva correlação entre a BF-ZP e o potencial dos embriões em se desenvolverem até o estágio de blastocisto. Em adição, Montag et al¹² tem demonstrado que embriões provenientes de oócitos com alta BF-ZP tem maior poder de implantação comparado com aqueles provenientes de oócitos com baixa BF-ZP, sugerindo o uso da BF-ZP, como critério de seleção oocitária.

Por outro lado, a espessura total da ZP (Esp-ZP) e a aparência das camadas individuais mudam de acordo com o estágio de maturação do oócito humano e o desenvolvimento pós-fertilização do embrião^{94,93}. A esp-ZP de cada embrião também tem sido correlacionada, positivamente, com a capacidade do embrião em desenvolver-se e implantar⁹⁵.

São muito poucas e recentes as evidências relatadas na literatura sobre os parâmetros FM e BF-ZP como preditores da qualidade oocitária.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi analisar a correlação entre os parâmetros tradicionais de avaliação da qualidade oocitária; a MN e a MC; o dismorfismo citoplasmático e a fertilização com os recentes parâmetros: imagem do FM e as características da ZP (BR – ZP, Esp-ZP).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no período de abril a dezembro de 2008 no Centro de Reprodução Humana, “Prof. Franco Júnior” – Ribeirão Preto– São Paulo.

3.1 POPULAÇÃO

Foram incluídas neste estudo, um total de 73 pacientes que participaram do programa de FIV e/ou injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) no Centro de Reprodução Humana “Prof Franco Júnior” e que apresentaram os critérios abaixo descritos.

Critérios de inclusão

- Idade entre 18-39 anos.
- Coleta de $\geq$ seis oócitos em estágio de metáfase II (MII) nos casos de pacientes que participaram do procedimento de maturação oocitária “in vitro”.
- Coleta de $\geq$ oito oócitos em estágio de MII nos casos de pacientes que participaram dos experimentos de dismorfismo e fertilização.

Todas as pacientes foram informadas sobre os objetivos dessa pesquisa de maneira clara e detalhada e assinaram o termo de consentimento preconizado pelo serviço (Anexo1). O estudo foi analisado e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa- CONEP (Anexo 2).

3.2 ESTIMULAÇÃO OVARIANA

Todas as pacientes foram submetidas ao mesmo esquema de estimulação ovariana. Inicialmente, o bloqueio hipofisário foi estabelecido com o uso de um análogo de GnRH (acetato de nafarelina/ Synarel, Searle, Brasil) na dose de 400µg/dia via nasal, iniciado durante a segunda fase do ciclo menstrual prévio. Após 14 dias de tratamento com o análogo e estabelecido o bloqueio, foi iniciada a administração de FSH recombinante (Gonal F®, Serono, Brasil) nas doses de 150 UI a 450 UI, via subcutânea pelo período de 7 dias. No oitavo dia da estimulação ovariana, começou a monitorização do desenvolvimento folicular por ultra-sonografia transvaginal, sendo as doses de r-FSH ajustadas de acordo com a resposta ovariana. Quando, no mínimo três folículos com diâmetro igual ou superior a 17mm foram observados, a gonadotrofina coriônica humana recombinante (r-hCG) (Ovidrel®, Serono, Brasil) foi administrada por via subcutânea na dose de 250µg.

3.3 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS OÓCITOS

A coleta dos oócitos foi realizada ambulatorialmente com anestesia do tipo sedação com propofol (Diprivan, Astrazeneca, Brasil) permanecendo a paciente em posição de litotomia. Os oócitos foram coletados dos folículos através de punção aspirativa transvaginal com agulhas de Frydman com 17

“gauge” (CCD, França) acopladas em seringas hipodérmica de 10ml (Becton Dickinson, Brasil) guiada por um transdutor ultra-sonográfico endovaginal, após 36-38 horas da injeção de r-hCG. Logo após a punção aspirativa do folículo, o fluido folicular obtido foi depositado em placas de Petri de cultura de células (Corning - USA, referência: 430166) para a identificação dos oócitos através de estéreo microscópio (Nikon - Japão, referência: SMZ 645) equipado com platina aquecedora (Tokai Hit Thermo Plate - Japão, referência: U4020WF) na temperatura de 37°C. Os oócitos identificados no fluido folicular foram transferidos para meio P1 (Irvine Scientific - USA, referência: 9910) pré-equilibrado com 3% de soro albumina humana (HSA) (Irvine Scientific – USA, referência: 9988) e incubados a 37°C em mistura gasosa com 5.8% de CO₂ até o momento da desnudação.

3.3.1 Desnudação oocitária

Após o período mínimo de uma hora e máximo de três horas, os oócitos foram transferidos para uma solução de 40 UI de hialuronidase (Irvine Scientific– USA, referência: 90101) diluída em meio de fluido tubário humano modificado (mHTF) (Irvine Scientific – USA, referência: 90126) contendo 3% de HSA (mHTF/10%HSA), por tempo máximo de 1 minuto onde parte das células da granulosa foram separadas dos oócitos. Logo após este período, os oócitos foram transferidos para meio mHTF/10%HSA e a remoção total das células do

cúmulus e da corona foi realizada através de várias pipetagens utilizando pipetador flexipet (Cook - USA, referência: K-FRO-1000) e micropipetas de desnudação de diâmetro de 140 µm (Cook - USA, referência: K-FPIP-1140). Em seguida, os oócitos foram lavados duas vezes em novo meio mHTF/3%HSA e classificados quanto a MN.

Todo esse procedimento foi realizado em uma placa de quatro poços (Nunc - Dinamarca, referência: 176740) na temperatura de 37°C, no tempo máximo de 10 minutos (FIG. 1).

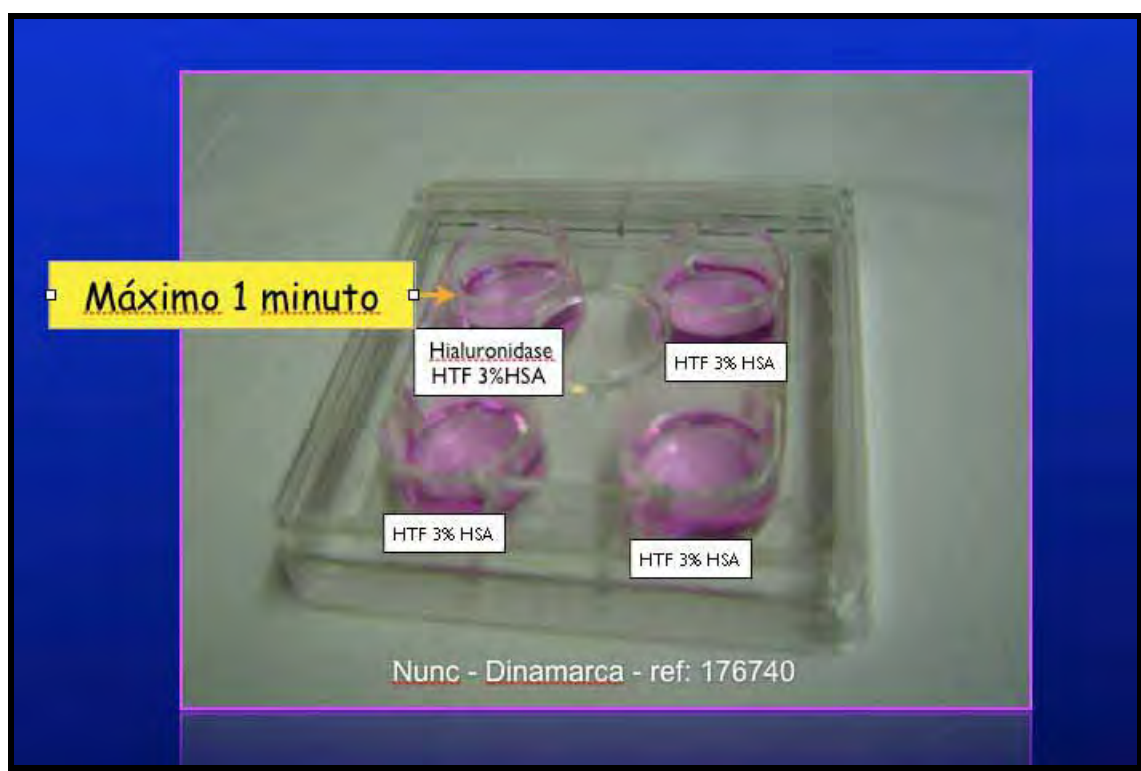


Figura 1 – Sistema para a desnudação oocitária

3.3.2 Classificação da maturidade nuclear

Os oócitos foram classificados quanto ao grau de maturidade nuclear utilizando microscopia de luz convencional, por microscópio invertido com objetiva de aumento de 200 x (Nikon - Japão, referência TE200) conforme descrição abaixo:

Oócitos imaturos

Oócitos em estágio de prófase I (FIG. 2), que apresentavam as seguintes características:

- Um largo e esférico núcleo contendo um único e grande nucléolo, denominado VG, posicionado, geralmente no centro do citoplasma, algumas vezes apresentando-se na parte periférica em período anterior a sua quebra
 - Ausência do primeiro CP
 - Forma esférica irregular
 - Citoplasma escuro granuloso
-



Figura 2 - Oócito imaturo (Prófase I)

Oócitos intermediários

Oócitos em estágio de metáfase I (FIG. 3). Estes oócitos completaram a prófase da meiose I, desaparecendo a VG. Durante este estágio, o FM se forma e os cromossomos paternos e maternos encontram-se alinhados aleatoriamente nos pólos. Este óvulos são caracterizados pela:

- Ausência de VG
- Ausência do primeiro CP
- Forma esférica regular
- Citoplasma claro com poucas granulações citoplasmáticas



Figura 3 - Oócito intermediário (Metáfase I)

Oócito maduros

Oócitos em estágio de metáfase II (FIG 4). Estes oócitos apresentam-se no estágio de meiose II depois da extrusão do primeiro CP.

Os oócitos em metáfase II são caracterizados pela:

- Presença do primeiro CP
- Forma esférica
- Citoplasma claro com granulações homogêneas



Figura 4 - Oócito maduro (Metáfase II)

Após a classificação da maturidade os oócitos foram transferidos para meio P1, pré-equilibrado com 3% de HSA, incubados a 37°C em mistura gasosa com 5.8% de CO₂ sendo, posteriormente, utilizados nos seguintes experimentos:

3.4 MATURAÇÃO NUCLEAR (EXPERIMENTO 1)

Um total de 83 oócitos imaturos recuperados durante a coleta foi cultivado “in vitro” por período de dois dias até alcançarem a MN completa (estágio de metáfase II). Durante este período em cultura, ou seja, do dia 0 ao dia 2, os oócitos foram observados em até cinco vezes (Tabela1) para a confirmação da presença da MN.

Tabela 1 - Horários de avaliação da maturação nuclear

	Dia 0		Dia 01		Dia 2
Tempo em cultura	1 hora	6 horas	24 horas	30 horas	48 horas

Dia 0 = dia da coleta, Dia 1= um dia após a coleta , Dia 2 = dois dias após a coleta

3.4.1 Cultura dos oócitos imaturos

Os oócitos imaturos foram cultivados individualmente em sistema de cultivo por microgotas (FIG. 5) em placa de Petri de cultura 60 x 15 mm (Corning - USA, referência: 430166). Um total de sete microgotas de 20 µl de meio de cultura P1 suplementado com 10% de HSA, foi depositado sobre cada placa de cultura e cobertas com 10 ml de óleo de parafina (Ovoil - Vitrolife – Suécia, ref: 10029) e mantidas em atmosfera de 5.8% de CO₂ por um período de quatro horas em temperatura de 37°C, para a obtenção da estabilização do sistema. Após este período, os oócitos imaturos foram transferidos para as microgotas desta placa e cultivados em incubadora com atmosfera de 5.8% de CO₂ em temperatura de 37°C por 24 horas. No dia 1 de cultura, ou seja, após 24 horas, os oócitos foram transferidos para nova placa de cultura contendo meio fresco e mantidos nesta por mais um dia.

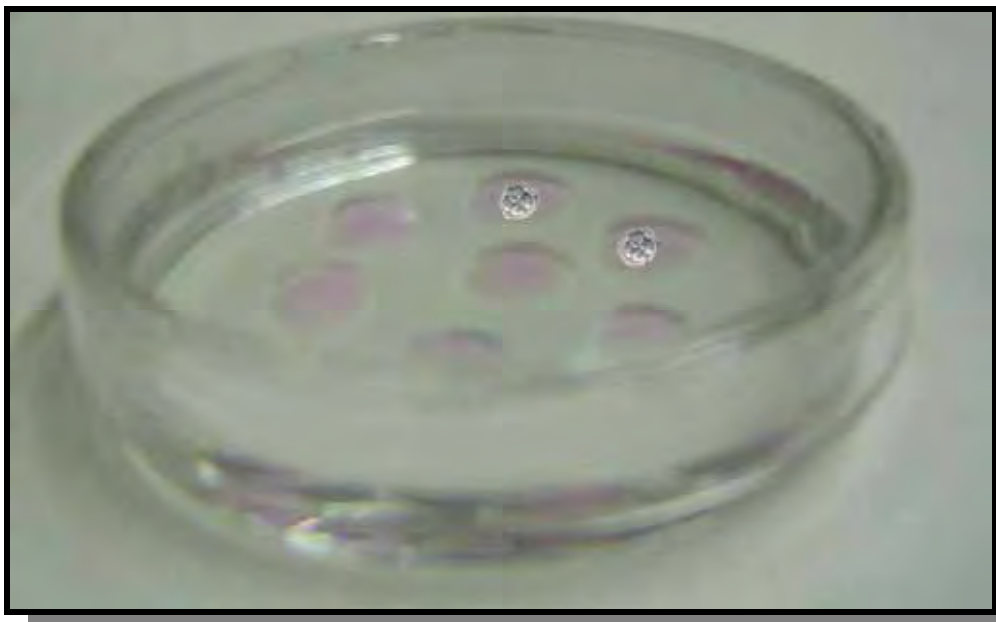


Figura 5 - Sistema de cultura por microgota

Durante o procedimento de MN, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- A- FM: presença e ausência
- B- ZP :
 - BF-ZP: presença e ausência
 - Esp- ZP

A- FUSO MEIÓTICO

A avaliação da presença ou ausência do FM foi feita em 58 oócitos maturados “in vitro”, em estágio MII, através de microscópio invertido (Nikon TE 200-Japão) equipado com objetivas de Hoffman 10 x, 20 x, e 40 x; um

sistema de microscopia de luz polarizada (FIG.6), isto é, um filtro circular polarizador, objetivas 25 x, cristal líquido (OCTAX ICSI GuardTM - OCTAX Microscience GmbH - Alemanha); implementado com uma camera; um software de sistema de imagem (OCTAX EyewareTM) (FIGS.7-11) e platina aquecedora (Tokai Hit Thermo Plate - Japão, referência: U4020WF) (FIG 12).

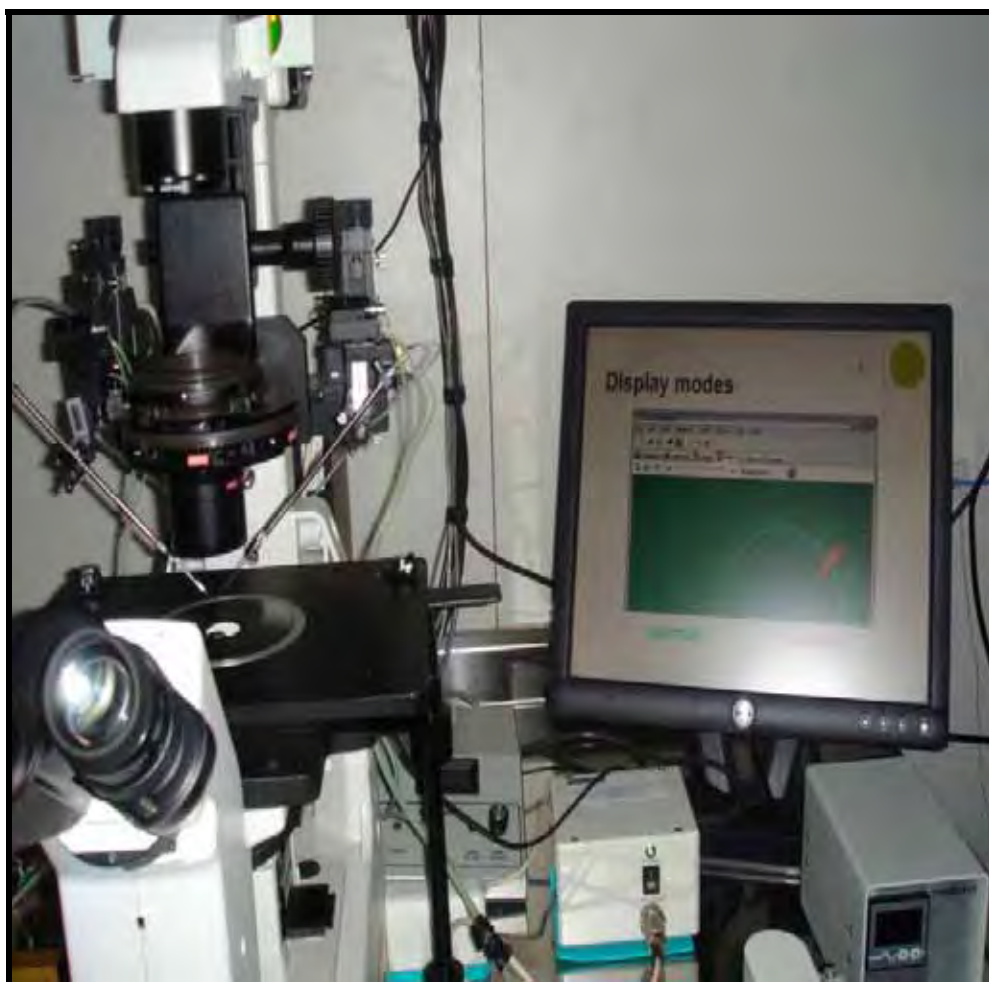


Figura 6 – Microscópio invertido Nikon com sistema de luz polarizada.

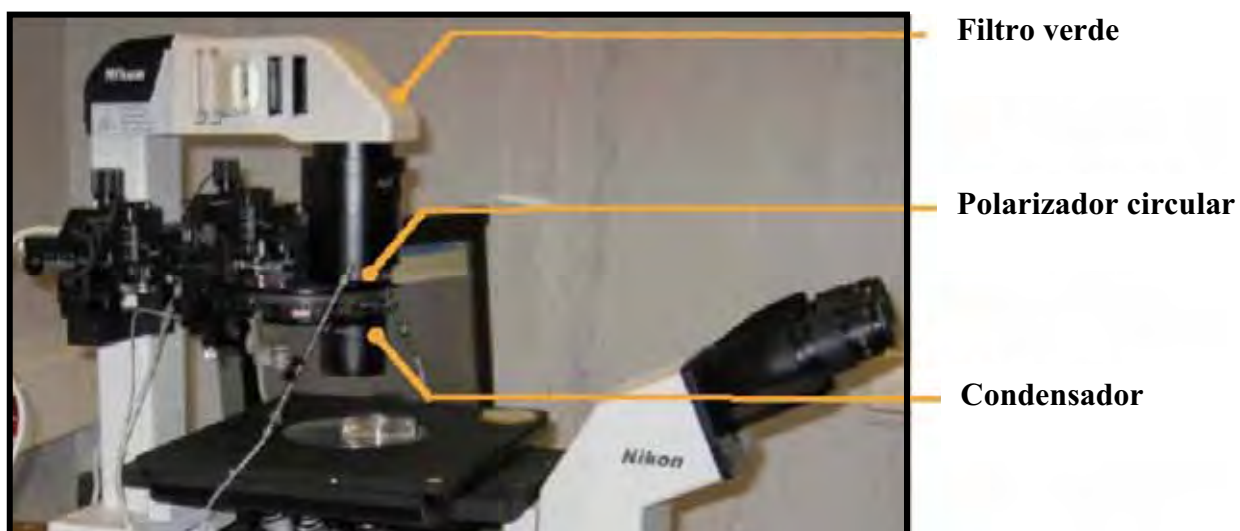


Figura 7 – Filtro circular polarizador

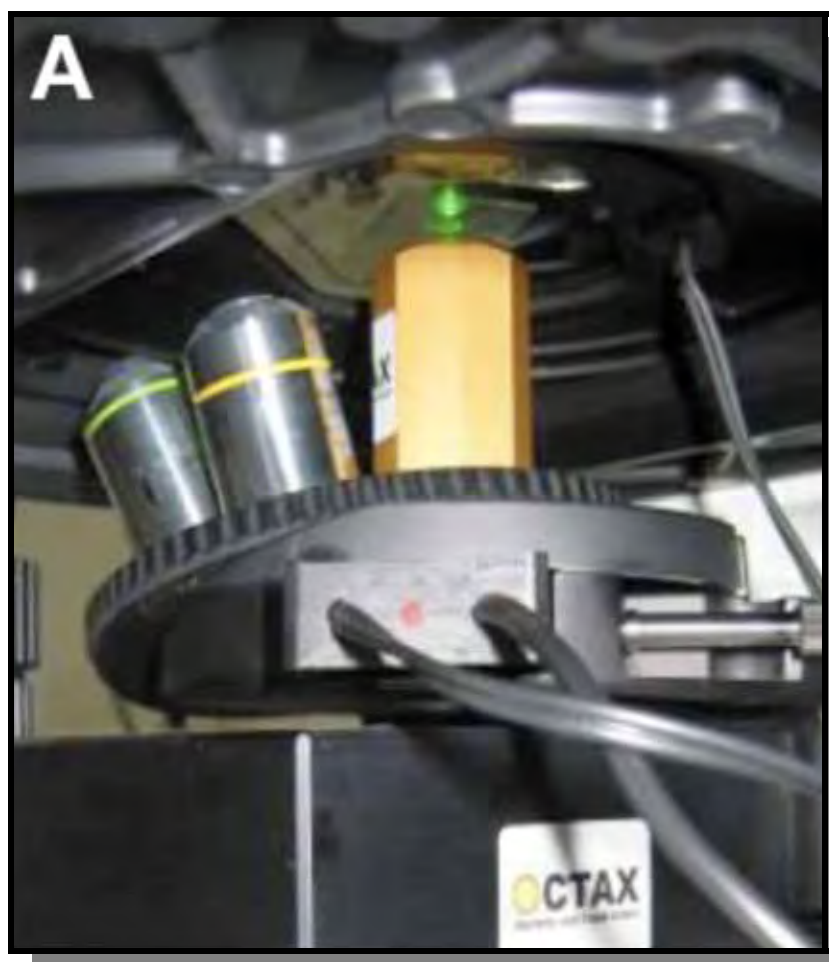


Figura 8 – Objetiva 25 x - OCTAX

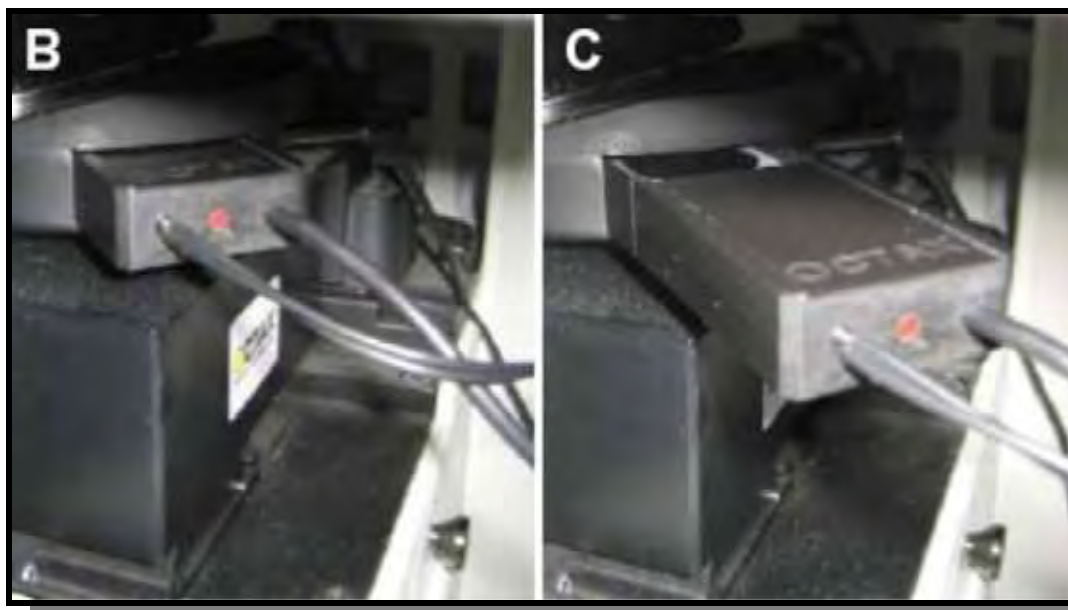


Figura 9 – Cristal líquido



Figura 10 – Câmera de imagens

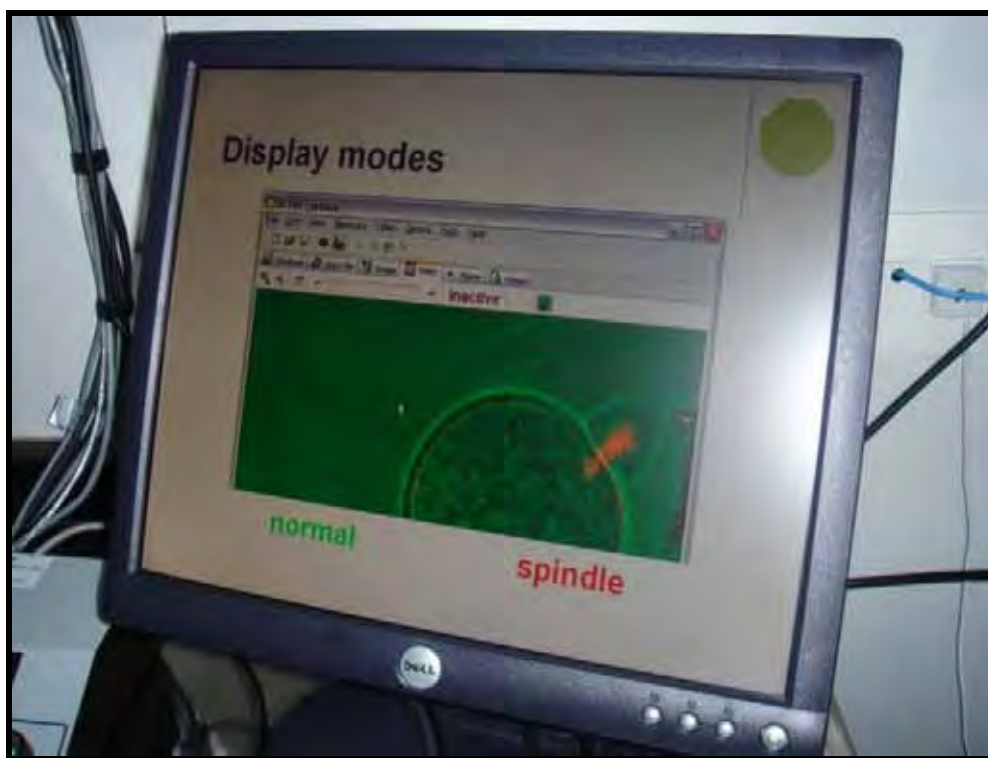


Figura 11 – Sistema de imagem - OCTAX Eyeware™

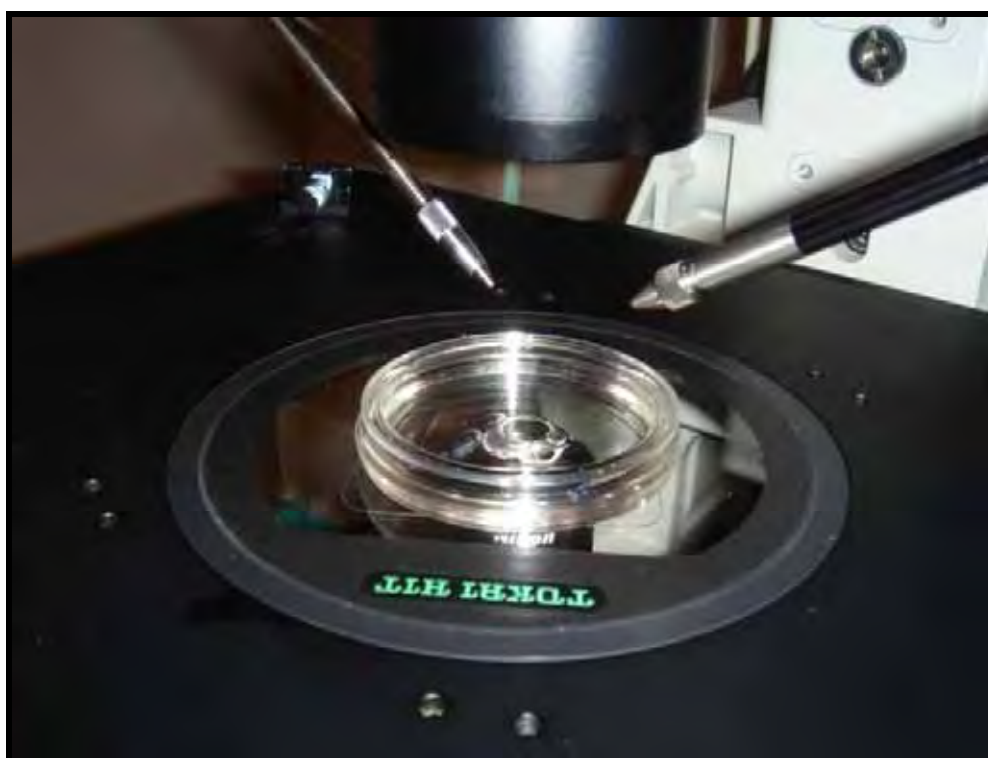


Figura 12 – Platina aquecedora Tokai

Os oócitos, em MII maturados “in vitro”, foram colocados individualmente em microgotas de 5µl de meio HTF tamponado contendo 10% de HSA dispostas sobre placas de vidro especiais para microscopia de luz polarizada (Fluordish – World Precision – USA) cobertas com óleo de parafina Ovoil e, previamente, equilibrada para temperatura de 37°C e pH de 7.3. Antes da análise do FM, os oócitos foram visualizados em microscopia de luz convencional e posicionados de forma a apresentarem o primeiro CP na posição de seis ou 12 horas. Em seguida, os filtros verdes de polarização foram ajustados para a avaliação do FM. Imagens individuais foram registradas e arquivadas em sistema de imagem computadorizada.

Os oócitos com presença do FM, apresentaram uma estrutura em coloração amarelada posicionados, na maioria das vezes, próximo do primeiro CP (FIG. 13). Por outro lado, os oócitos, com ausência de FM, não apresentaram esta estrutura em qualquer região do citoplasma (FIG. 14).

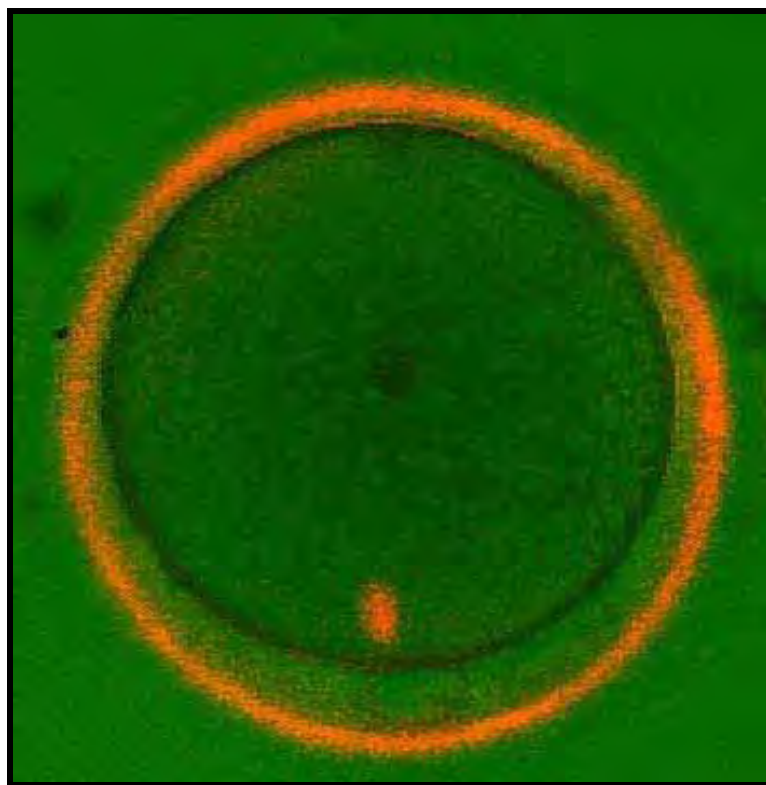


Figura 13 – Oócito em metáfase II com fuso meiótico presente.



Figura 14 – Oócito em metáfase II com ausência de fuso meiótico

O segundo parâmetro avaliado durante a MN foi a ZP.

B - ZONA PELÚCIDA

1- Birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP)

Durante o processo de maturação “in vitro”, os oócitos foram avaliados quanto à presença ou não da BF- ZP em todas os seus estágios de maturação (VG, MI e MII), através do mesmo sistema de microscopia utilizado para a avaliação do FM, como descrito anteriormente, porém com um programa (OCTAX EyeWare MX PolarAide - OCTAX Microscience GmbH – Alemanha) que quantifica, automaticamente, a espessura e a birrefringência da ZP em um escore positivo ou negativo (FIG. 15).

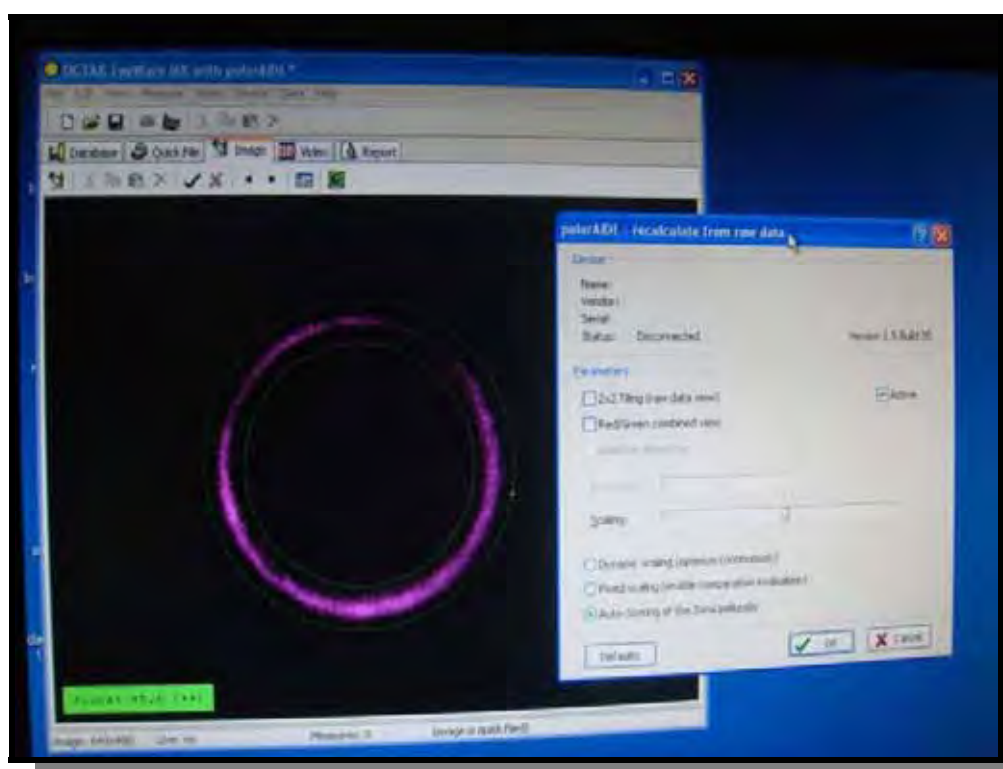


Figura 15 - Programa de avaliação da birrefringência da ZP- OCTAX EyeWare polarAIDE.

A BF-ZP foi considerada positiva quando o escore apresentou um valor numérico positivo. Neste caso, a imagem da BF-ZP era de cor lilás forte e uniforme em toda a superfície da ZP (FIG. 16). Por outro lado, a BF-ZP foi considerada negativa quando o escore mostrou um valor numérico negativo. Nessa ocasião, a imagem da BF-ZP apresentava-se de cor lilás fraca e/ou não uniforme em toda a superfície da ZP (FIG. 17).

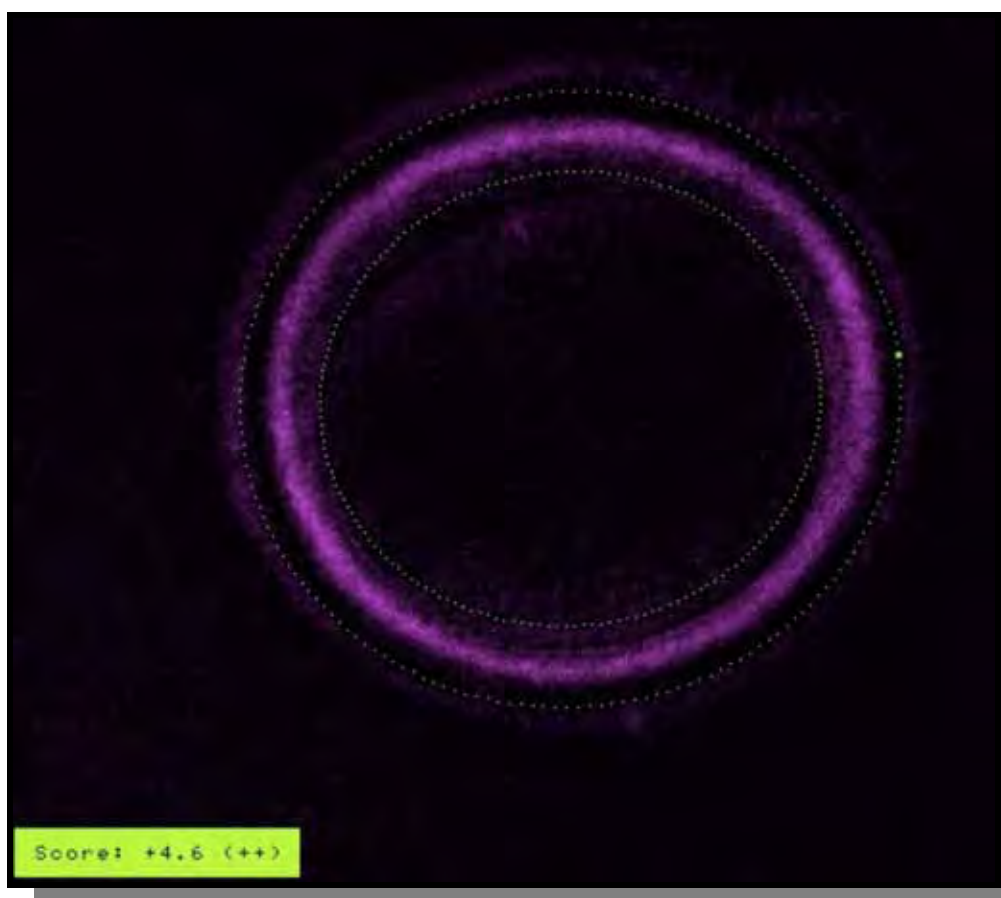


Figura 16 - Imagem de um oócito com BF-ZP positiva.

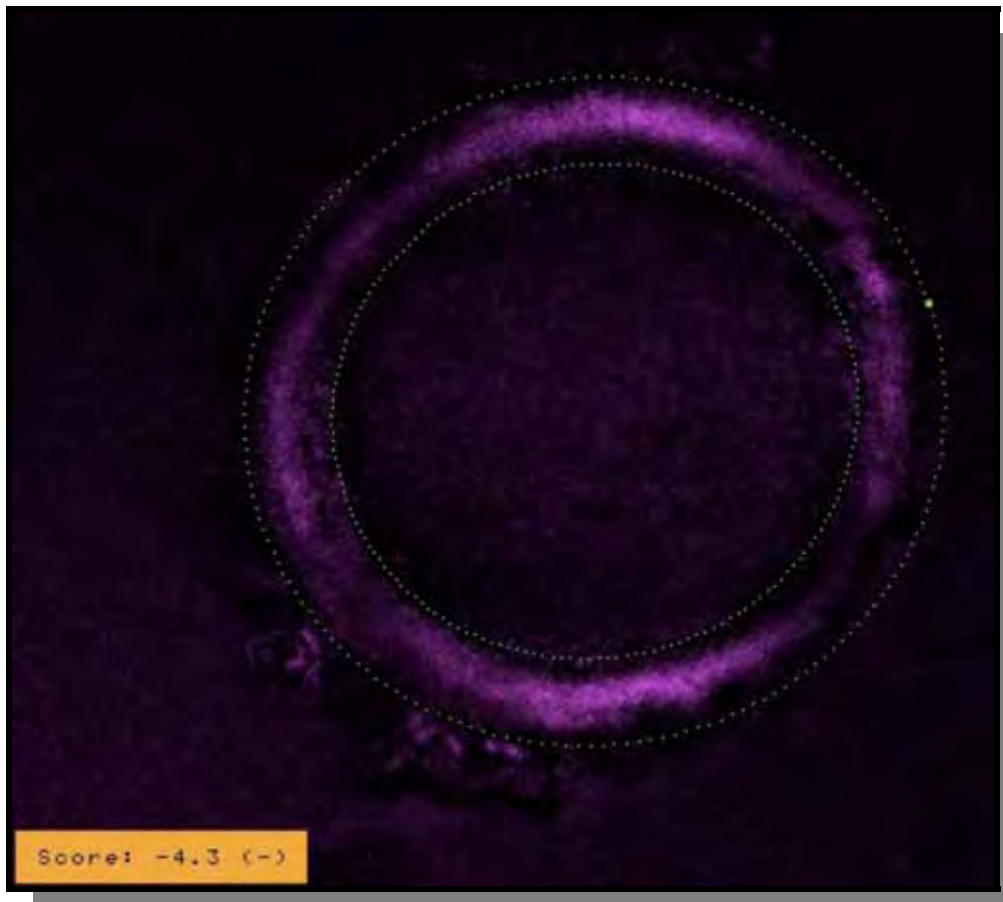


Figura 17 - Imagem de um oócito com BF-ZP negativa.

2- Espessura total da zona pelúcida (Esp-ZP)

A medida da Esp-ZP foi calculada através do software “polarAIDE”. A média de quatro medidas da ZP referente às posições norte, sul, leste, oeste, foi calculada conforme esquema abaixo (FIG.18).

Média da espessura total = $\text{Esp total-norte} + \text{Esp total-sul} + \text{Esp total-leste} + \text{Esp total oeste} / 4$



Figura 18 - Medidas da espessura da zona pelúcida (μm) em quatro posições (norte,sul,leste e oeste)

3.5 MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA (EXPERIMENTO 2)

Um total de 29 oócitos cultivados “in vitro”, que atingiu a MN completa, após o mínimo de 24h e o máximo de 48h em cultura foi analisado quanto à MC pela técnica de coloração dos GC descrita por Cherr *et al.* ⁹⁶ com algumas modificações.

3.5.1 Coloração da cromatina e dos GC

Os 29 oócitos maturados “in vitro” foram transferidos para uma solução de pronase a 0.5% em tampão salino fosfato (PBS) mantidos a temperatura de 37°C por, aproximadamente, cinco minutos para a remoção da ZP. Em seguida, os oócitos sem a ZP foram fixados a 3% de formaldeído em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente e mantidos a 4°C em solução de bloqueio (SB - 1mg/ml de soro albumina bovino, 100mM de glicina e 0.2% de azida sódica) por no mínimo 24 horas e máximo de 5 dias. Para a permeabilização, os oócitos foram tratados por cinco minutos a temperatura de 38°C em SB acrescida de 0.1% de triton X-100. Os oócitos foram incubados em 10µg/ml aglutinina de *Lens culnaris* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-LCA) em SB por 15 minutos; esta lecitina liga-se especificamente, à alpha D-manose presente nos GC. Logo após esta incubação, os oócitos foram lavados três vezes em SB, corados com 10µg de Hoechst 33342 em SB por 10 minutos; lavados novamente em SB, e, em seguida, fixados entre lâminas e lamínulas. Para uma melhor fixação dos oócitos nas lâminas, estes foram transferidos para solução de PBS de 1 mg/ml polivinilpirrolidona por um minuto antes de serem depositados sobre 2 µl de glicerol dispostos nas lâminas. A MC foi avaliada sob filtro de excitação de 400-600 nm (DAPI) disposto em um microscópio de fluorescência (Olympus – Japão, referência: BX50).

Os oócitos que apresentaram GC dispostas apenas na periferia foram considerados como oócitos com presença de MC completa (FIG. 19). Por outro lado, os oócitos que apresentavam GC no centro do citoplasma, ou no centro e periferia, foram rotulados como oócitos com ausência de MC (FIG.20).

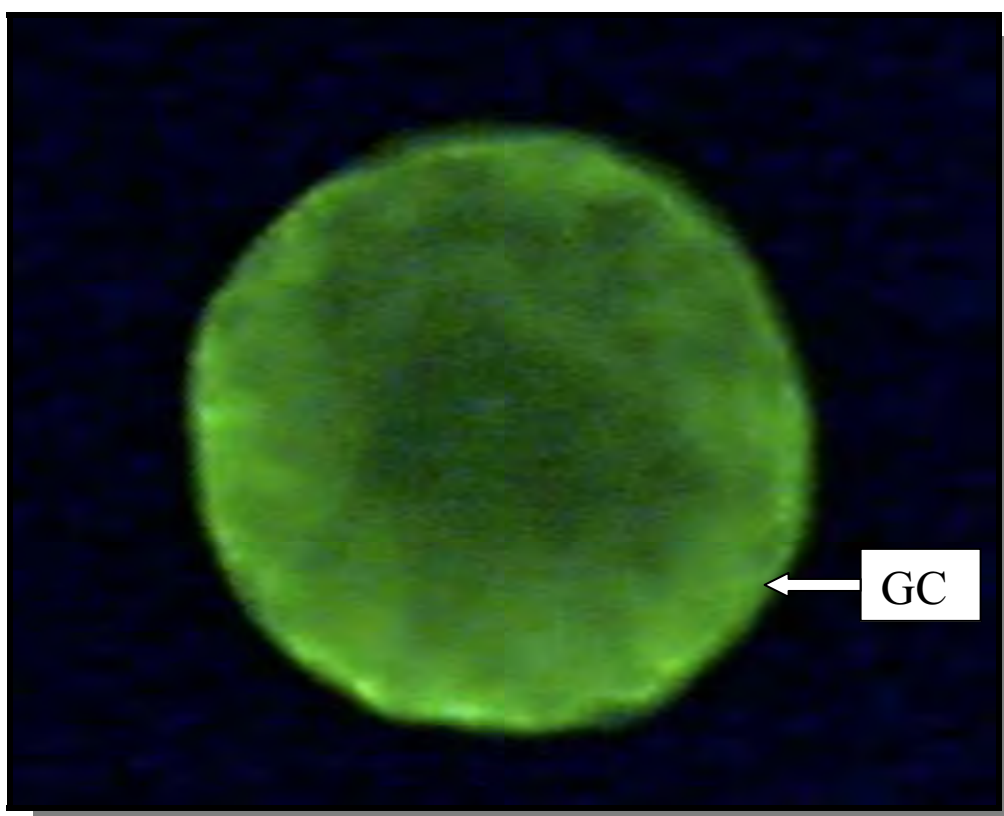


Figura 19 – Oócito em estágio de MII, com maturação citoplasmática completa (GC dispostos na periferia)

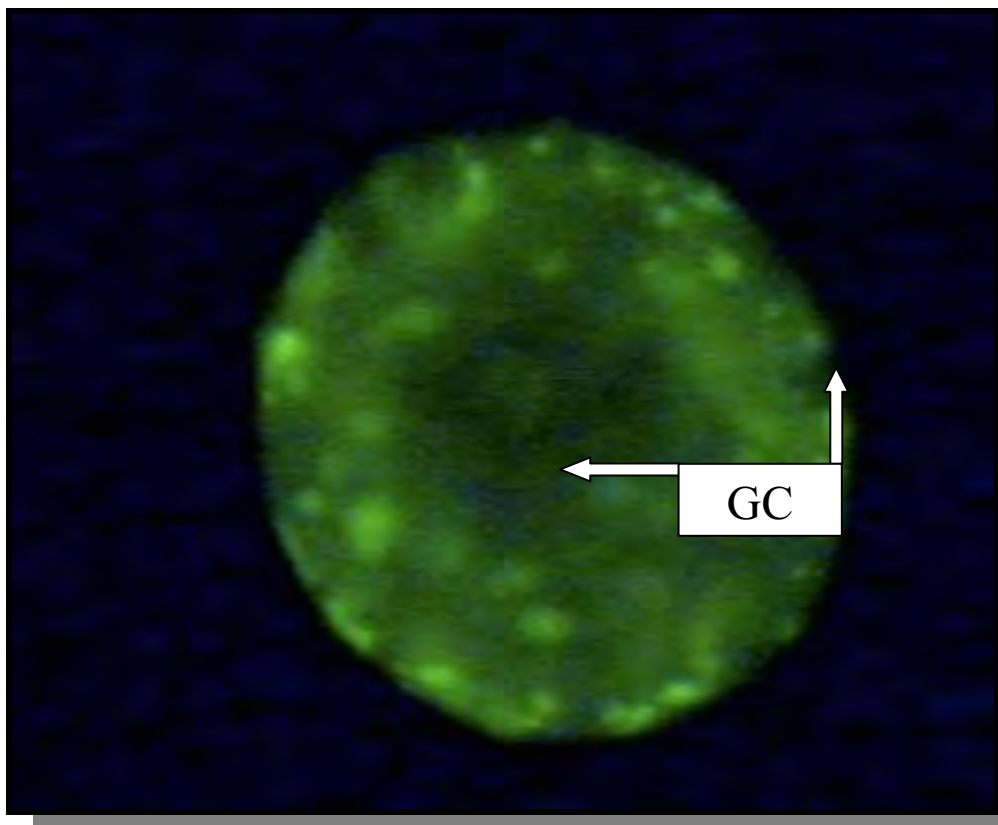


Figura 20 – Oócito em estágio de MII, com ausência de maturação citoplasmática (GC dispostos na periferia e no centro)

Os 29 oócitos em MII, com MC presente ou não, foram avaliados quanto: ao FM (presença ou ausência); às características da ZP (presença ou não BF-ZP, esp ZP), conforme descrito anteriormente e em relação a variação da espessura da ZP (VZP).

Variação da espessura da zona pelúcida (VZP)

Para a avaliação da esp-ZP, quatro medidas de sua espessura, em quatro diferentes posições do oócito (norte , sul , leste, oeste) de cada oócito foram realizadas (FIG.18). O cálculo da VZP, em porcentagem, foi obtido de acordo com Cohen *et al.*⁹⁷ através da fórmula:

$$VZP = \frac{\text{EspZP máxima} - \text{EspZP média}}{\text{Esp Zpmédia}} \times 100 (\%)$$

3.6 DISMORFISMO OOCITÁRIO (EXPERIMENTO 3)

Um total de 260 oócitos em MII, recuperados durante a coleta, foi avaliado quanto à presença ou não de AIC, através de microscopia de convencional luz invertida (Nikon-Japão-referência TE200) equipada com objetiva Hoffman com aumento de 200 x, câmera e video para arquivo de imagens (FIG.21). Logo após a desnudação dos oócitos, aqueles que se apresentaram em estágio de MII foram transferidos para microgotas de 5 µl de meio HTF tamponado e suplementado com 10% HSA, em placas de Petri de cultura cobertas com óleo de parafina Ovoil e, previamente, equilibrada para temperatura de 37°C e pH de 7.3, fotografados individualmente e avaliados quanto à presença ou não de AIC.



Figura 21 - Microscópio de luz convencional Nikon

Os oócitos rotulados com AIC presente foram aqueles que apresentaram, no mínimo uma das características AIC descritas abaixo:

A- Presença de granulações heterogêneas (granulações escuras no centro ou em parte isolada do citoplasma) (FIG.22) ou homogêneas (granulações escuras espalhadas por todo citoplasma) (FIG.23 a e b).



Figura 22 – Oócito em MII com granulações no centro do citoplasma



Figura 23a – Oócito em MII com granulações na lateral do citoplasma



Figura 23b – Oócito MII com granulações em todo o citoplasma

B- Presença de pequenos corpos refratários no citoplasma (FIG. 24 a e b).



Figura 24 a,b – Oócito em MII com presença de corpos refratários no citoplasma

C- Presença de agregados de RE (pequenos círculos claros dentro citoplasma) (FIG. 25).



Figura 25 – Oócito em MII com presença de agregados de retículo endoplasmático

D- Presença de vacúolos no citoplasma (FIG.26 a,b).



Figura 26 a,b – Oócito com vacúolos no citoplasma

Os 260 oócitos em MII com AIC presente ou não foram avaliados quanto ao FM (presença ou ausência), e quanto as características da ZP (BF-ZP positiva ou negativa, esp-ZP), conforme descrito anteriormente.

3.7 FERTILIZAÇÃO OOCITÁRIA (EXPERIMENTO 4)

Um total de 216 oócitos em MII recuperados durante a coleta foi avaliado quanto a presença ou não de fertilização. Logo após a ICSI, os oócitos foram transferidos para o sistema de cultura por microgota e cultivado individualmente por dois dias em microgotas de 20 µl de meio P1 suplementado com 10% HSA em atmosfera de 5.8% de CO₂ e temperatura de 37°C. No período de 19 a 25 horas após a ICSI, a avaliação da fertilização foi realizada através de microscopia de luz invertida equipada com objetiva Hoffman com aumento de 200 x. Os oócitos foram classificados quanto a fertilização, tendo por base a presença de PN no citoplasma. Aqueles que apresentavam 2PN foram caracterizados como fertilização normal presente (FIG.27). Enquanto que os oócitos que não apresentaram 2PN no citoplasma foram considerados não fertilizados.

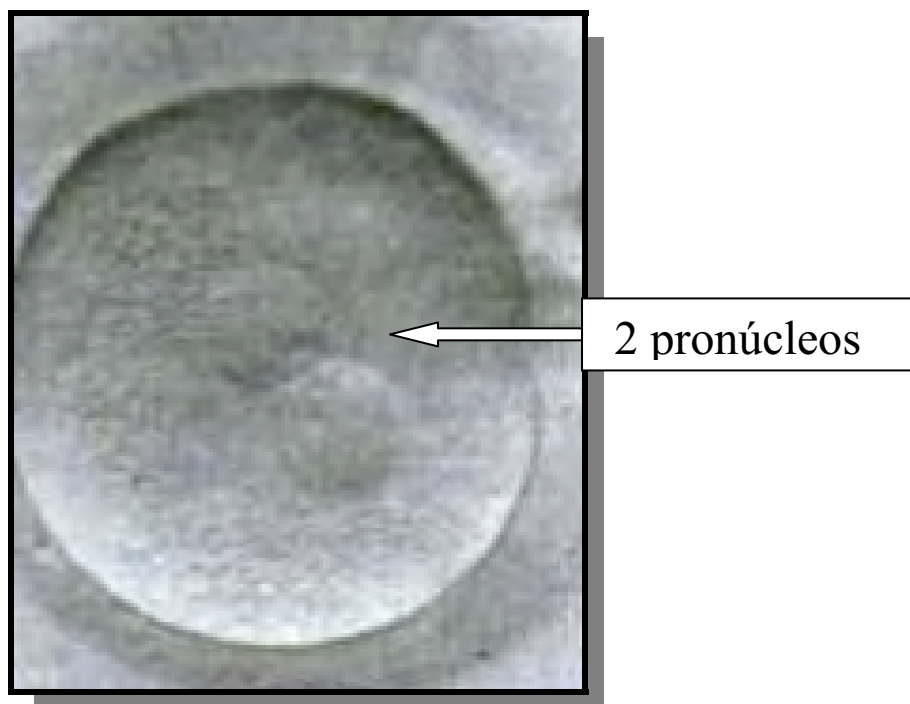


Figura 27 – Oócito em estágio MII com fertilização normal presente (presença de 2PN no citoplasma).

Os 216 oócitos em MII, fertilizados ou não, foram avaliados quanto ao FM (presença ou ausência), e quanto às características da ZP (BF-ZP positiva ou negativa, esp- ZP), conforme descrito anteriormente.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos de Qui-quadrado, exato de Fisher, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e os coeficientes de correlação “phi”, o de contingência de Pearson e o de V de Cramér foram empregados quando indicados, utilizando-se os programas: Instat 3 para Macintosh (La Jolla, USA) e/ou StatsDirect (Cheshire, UK).

4- RESULTADOS

4.1 MATURAÇÃO NUCLEAR

Um total de 38 pacientes coletou 83 oócitos em estágio de VG. As características gerais deste grupo de pacientes estão dispostas na Tabela 2. Do total de 83 oócitos que iniciaram a maturação “in vitro”, 58 oócitos atingiram a MN (estágio MII), ou seja, 69.9% dos oócitos.

Tabela 2 - Características gerais da população que participou do experimento de maturação nuclear.

Características	
Pacientes (n)	38
Idade (média $\pm$ dp)	34.34 $\pm$ 4.04
Etiologia:	
-Fator masculino	36.8%
-ESCA	13%
-Endometriose	21.3%
-Tubo-peritoneal	10.5%
-Multi causas	18.4%
Nº de oócitos coletados	614
Nº de oócitos MII	414
Nº de oócitos VG	83

4.1.1 Maturação nuclear versus fuso meiótico

Dos 58 oócitos que atingiram a MN, o FM foi visualizado em 30 oócitos (51.7%), sendo que nos 28 oócitos restantes o FM não foi visualizado em qualquer região do citoplasma.

4.1.2 Maturação nuclear versus características da zona pelúcida

a- Birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP).

Dos 83 oócitos coletados em VG, (88%) apresentaram BF-ZP positiva. Dos 58 oócitos em VG que alcançaram a maturação “in vitro”, 48 (82.7%) apresentaram BF-ZP positiva, enquanto que apenas 10 (17.3%) apresentaram BF-ZP negativa. Ao atingirem o estágio de MI, a BF-ZP apresentou-se positiva em 75.8% dos oócitos, enquanto que 24.2% apresentaram BF-ZP negativa. Entretanto, no momento em que os oócitos atingiram a MN, isto é, estágio de M II, 82.7% deles apresentaram BF-ZP positiva e 17.3% BF-ZP negativa. A correlação entre esses dois parâmetros: MN e a BF-ZP, não foi estatisticamente significativa ($p=0.55$). Além disso, observou-se que o coeficiente de contingência de Pearson (0.081) e o V de Cramér (0.081) foram muito baixos (Tabela 3).

Tabela 3 - Correlação da maturação nuclear (VG, MI, MII) com a birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP)

	BF-ZP Positiva	BF-ZP Negativa
VG	48	10
M I	44	14
M II	48	10

Qui-quadrado = 1.17 $p=0.55$

Coeficiente de contingência de Pearson = 0.081

V de Cramér = 0.081

b- Espessura total da zona pelúcida (Esp-ZP).

A média da esp-ZP dos oócitos não demonstrou alteração significativa ($p=0.94$) durante a maturação “in vitro”(Tabela 4).

Tabela 4 – Espessura total da zona pelúcida em oócitos no estágio de vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI) e metáfase II (MII), durante a maturação nuclear.

	Espessura da ZP (μm)
VG	20.22 ± 2.56
MI	20.28 ± 2.86
MII	20.12 ± 2.68

Teste de Kruskal-Wallis = 0.94

4.2 MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA

A MC foi estudada em 16 pacientes do total de 38 que coletaram óvulos para o experimento de MN. Na Tabela 5, são relatadas as características gerais dessa população . Um total de 78 oócitos foram fixados para a avaliação da MC. Entretanto, apenas 29 (37.1 %) obtiveram sucesso nesta avaliação. Os 49 óocitos restantes não participaram dos resultados por problemas técnicos: ruptura do citoplasma no momento da remoção da ZP ou da fixação do oócito, ou pela ausência de coloração padrão. Dos 29 oócitos avaliados, 16 (55%) atingiram a MC completa.

Tabela 5 - Características gerais da população que participou do experimento de maturação citoplasmática.

Características	
Pacientes (n)	16
Idade (média $\pm$ dp)	34.5 $\pm$ 4.03
Etiologia:	
-Masculino	50%
-ESCA	12.5%
-Endometriose	6.3%
-Tubo-peritoneal	12.5%
-Multi causas	18.7%
Nº de oócitos coletados	211
Nº de oócitos em MII	143
Nº de oócitos que atingiram MN, fixados e estudados	29

4.2.1. Maturação citoplasmática versus fuso meiótico

De um total de 29 oócitos avaliados, 31% (n=9) demonstraram presença de MC e de FM, enquanto que 17.2% (n=5) apresentaram FM, porém, ausência de MC. Por outro lado, 27.6% dos oócitos avaliados (n=8) demonstraram a ausência de MC e do FM, enquanto que 24.2% (n=7) apresentaram ausência de FM, porém, presença de MC. Uma correlação baixa entre MC e o FM foi obtida (coeficiente de “phi”= 0.17)(Tabela 6).

Tabela 6 - Correlação da maturação citoplasmática (MC) com a presença ou ausência do fuso meiótico (FM)

	FM Presente	FM Ausente
MC Presente	9	7
MC Ausente	5	8

Teste exato de Fisher p=0.46
Coeficiente de correlação “phi”= 0.17

4.2.2 Maturação citoplasmática versus características da zona pelúcida

a- Birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP).

Um total de 29 oócitos foram avaliados quanto a MC e BF-ZP. A MC esteve presente em 16 oócitos, sendo que 68.7% destes apresentaram BF-ZP positiva. Enquanto que dos 13 oócitos que apresentaram ausência de MC, 46.1% destes a BF-ZP estava positiva. Por outro lado, dos 16 oócitos com MC presente, 31.3% dos oócitos apresentaram BF-ZP negativa, enquanto que dos 13 com ausência de MC, 53.9% apresentaram BF-ZP negativa. A Tabela 7 mostra uma baixa correlação da MC com BF-ZP, coeficiente “phi” = 0.22.

Tabela 7 - Correlação da maturação citoplasmática (MC) com a birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP)

	BF-ZP Positiva	BF-ZP Negativa
MC Presente	11	5
MC Ausente	6	7

Teste exato de Fisher p=0.27

Coeficiente de correlação “phi”= 0.22

b- Espessura total da zona pelúcida (Esp-ZP).

Não houve diferença significativa (p=0.71) na Esp-ZP dos oócitos que obtiveram MC presente comparados com aqueles com MC ausente (Tabela 8).

c- Variação da espessura da zona pelúcida (VZP).

Não houve diferença significativa ($p=0.67$) entre a VZP dos oócitos com MC presente comparados com aqueles com MC ausente (Tabela 8)

Tabela 8 - Espessura total da zona pelúcida (Esp-ZP) e variação da espessura da zona pelúcida (VZP) em oócitos com presença e ausência de maturação citoplasmática (MC)

	Esp-ZP (μm)	VZP (%)
MC Presente	19.8 ± 3.47	14.5 ± 8.8
MC Ausente	18.8 ± 1.56	15.5 ± 8.0

Teste de Mann-Whitney
Esp-ZP, $p=0.71$; VZP, $p=0.67$

4.3 DISMORFISMO OOCITÁRIO

Um total de 35 pacientes coletou 280 oócitos em estágio de MII. As características gerais deste grupo de pacientes estão dispostas na Tabela 9.

Tabela 9 - Características gerais da população que participou do experimento de dismorfismo oocitário.

Características	
Pacientes (n)	35
Idade (média $\pm$ dp)	33.55 ± 4.49
Etiologia:	
-Fator masculino	54%
-ESCA	8.5%
-Endometriose	8.5%
-Tubo-peritonal	17%
-Multi causas	12%
Nº de oócitos coletados	534
Nº de oócitos MII	400
Nº de oócitos MII estudados	280

4.3.1 Dismorfismo versus fuso meiótico

Um total de 85 oócitos foi estudado quanto aos parâmetros AIC e FM. Destes, 36.5% dos oócitos (n=31) mostraram presença de AIC e presença do FM; enquanto que 23.5% (n=20) apresentaram o FM, porém, ausência de AIC. Por outro lado, uma pequena parte dos oócitos n=10 (11.8%) apresentou ausência de AIC e do FM, sendo que 28.2% dos oócitos apresentaram ausência de FM e presença de AIC. A correlação entre o AIC e o FM foi baixa (coeficiente de “phi”= 0.10). (Tabela 10).

Tabela 10 - Correlação das anomalias intracitoplasmáticas (AIC) com a presença ou ausência do fuso meiótico (FM)

	FM Presente	FM Ausente
AIC Presente	31	24
AIC Ausente	20	10

Teste exato de Fisher p=0.48

Coeficiente de correlação “phi”= 0.10

4.3.2 Dismorfismo versus características da zona pelúcida

a- Birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP).

Um total de 280 oócitos foi estudado quanto os parâmetros AIC e BF-ZP. A AIC estava presente em 158 oócitos (56.4%). Destes, 34.2% (n=54) apresentaram BF-ZP positiva, sendo a maioria deles (65.8%) com BF-ZP negativa. Por outro lado, de um total de 122 oócitos que não demonstram

nenhuma AIC, 42.6% (n=52) apresentaram BF-ZP positiva enquanto que os 70 oócitos restantes (57.4%) apresentaram BF- ZP negativa.

A Tabela 11 mostra uma fraca correlação (coeficiente de “phi”= 0.086) entre AIC e BF-ZP.

Tabela 11 - Correlação das anomalias intracitoplasmáticas (AIC) com a birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP)

	BF-ZP Positiva	BF-ZP Negativa
AIC Presente	54	104
AIC Ausente	52	70

Qui quadrado p=0.14

Coeficiente de correlação “phi”= 0.086

b - Espessura total da zona pelúcida (Esp-ZP).

A esp-ZP não variou com presença ou não de AIC (Tabela 12).

Tabela 12 - Espessura total da zona pelúcida (esp-ZP) em oócitos com presença ou ausência de anomalias intracitoplasmáticas (AIC)

	Esp-ZP (μ m)
AIC Presente	19.7 $\pm$ 2.89
AIC Ausente	19.0 $\pm$ 2.27

Teste de Mann-Whitney = 0.21

4.4 FERTILIZAÇÃO

As características gerais do grupo de 35 pacientes em que a fertilização foi avaliada estão dispostas na Tabela 13.

Tabela 13 - Características gerais da população em que a fertilização foi avaliada.

Características	
Pacientes (n)	35
Idade (média $\pm$ dp)	33.55 $\pm$ 4.49
Etiologia:	
-Fator masculino	54%
-ESCA	8.5%
-Endometriose	8.5%
-Tubo-peritonal	17%
-Multi causas	12%
Nº de oócitos coletados	534
Nº de oócitos MII	400
Nº de oócitos MII estudados	216

4.4.1 Fertilização versus fuso meiótico

Um total de 216 oócitos foi avaliado quanto as variáveis fertilização e FM. A fertilização ocorreu em 68% (n=147) dos oócitos. Do total avaliado, 54.2% apresentaram fertilização e FM presente, enquanto que 24% apresentaram ausência de fertilização e presença de FM. Por outro lado, 7.8% apresentaram ausência de fertilização e FM, enquanto que 13.8% apresentaram ausência FM e fertilização presente. A correlação entre a fertilização e o FM foi muito baixa: coeficiente “phi”=0.047 (Tabela 14).

Tabela 14 - Correlação da fertilização com a presença ou ausência do fuso meiótico (FM)

	FM Presente	FM Ausente
FERTILIZAÇÃO Presente	117	30
FERTILIZAÇÃO Ausente	52	17

Teste exato de Fisher $p=0.48$

Coefficiente de correlação “phi”= 0.047

4.4.2 Fertilização versus características da zona pelúcida

a- Birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP).

Um total de 216 oócitos foram avaliados quanto os parâmetros fertilização e BF-ZP. Um total de 46 (31.3%) oócitos apresentou BF-ZP positiva entre os 147 oócitos fertilizados, sendo que em 101 (68.7%) a BF-ZP estava negativa. Entre os oócitos não fertilizados (n=69), em 62% deles a BF-ZP foi negativa. A BF-ZP estava positiva em apenas 26 oócitos (37.7%), A correlação entre a fertilização dos oócitos e a presença ou não da BF-ZP foi baixa (coeficiente “phi” = 0.063)(Tabela 15).

Tabela 15 - Correlação da fertilização com birrefringência da zona pelúcida (BF-ZP)

	BF-ZP Positiva	BF-ZP Negativa
FERTILIZAÇÃO Presente	46	101
FERTILIZAÇÃO Ausente	26	43

Teste exato de Fisher $p=0.35$

Coefficiente de correlação “phi”= 0.063

B - Espessura total da zona pelúcida (Esp-ZP).

A esp-ZP foi estatisticamente semelhante com presença ou não de fertilização (Tabela 16).

Tabela 16 - Espessura da zona pelúcida (esp-ZP) em oócitos com presença ou ausência de fertilização

	Esp-ZP (μm)
FERTILIZAÇÃO Presente	19.8 ± 3.23
FERTILIZAÇÃO Ausente	20.2 ± 3.03

Teste de Mann-Whitney = 0.49

5- DISCUSSÃO

Nos últimos anos, foram descritos dois parâmetros não invasivos de qualidade oocitária: a birrefringência da ZP e a visualização do FM. Entretanto, ainda são poucos os trabalhos que analisam suas vantagens e desvantagens, especialmente, suas correlações com parâmetros clássicos de avaliação oocitária (maturação, dismorfismo e a fertilização). A incorporação dessas novas tecnologias em um programa de ICSI produz mudanças importantes nos procedimentos rotineiros de manuseio dos oócitos, situação que pode provocar repercussões positivas ou negativas, mas que precisam ser identificadas. Além disso, essas tecnologias de avaliação oocitária são caras, quando comparadas com as tradicionais, que dependem apenas do sistema de microscopia já existente em serviços que habitualmente empregam a técnica de ICSI. Dessa forma, deve ser sempre analisada a relação custo/benefício de uma nova tecnologia.

A ZP é uma camada glicoprotéica, que é coordenadamente secretada pelo oócito, durante a foliculogênese como foi demonstrado em camundongos^{56,57}. Contudo, a célula da granulosa do folículo ovariano da mulher também contribui na produção das proteínas da ZP durante o processo de foliculogênese^{59,60,98}. Com relação ao nível molecular, a ZP consiste de uma estrutura paracristalina e tridimensional composta de filamentos heterodiméricos de proteínas chamadas de ZP1, ZP2, ZP3 e ZP4. Do ponto de vista teórico, a idéia de uma correlação entre a ZP e a qualidade oocitária estaria intimamente

ligada a uma perfeita conexão funcional entre as células da granulosa e o oócito mediada pela ZP. Ao contrário, poderia indicar uma situação de subfertilidade, quando uma reduzida expressão das proteínas da ZP estivesse presente, fato que poderia provocar uma insuficiência no processo de maturação oocitária durante a foliculogênese, por interferir nas comunicações bioquímicas entre as células da granulosa e o ooplasma⁹. Gook *et al.*⁹⁸, acreditam que as proteínas da ZP aumentam no citoplasma das células da granulosa e do oócito durante o progredir do desenvolvimento folicular. Além disso, a presença das proteínas da ZP em folículos primordiais também foi detectada, confirmando a hipótese de sua origem com o processo de oogênese.

Shen *et al.*⁹ observaram em estudo retrospectivo que a magnitude da retardância e da espessura da camada interna da ZP foi maior nos oócitos que resultaram em ciclos com gestação do que naqueles que ocasionaram ciclos sem concepção. Na mesma linha de pensamento, Montag *et al.*¹² observou em um estudo prospectivo, analisando pacientes submetidas a um programa de ICSI, que a alta (positiva) birrefringência da ZP estava significativamente ligada a uma maior taxa de implantação embrionária, gravidez e de nascidos vivos por ciclo. Ao contrário, Çiray *et al.*⁹⁹, não observou diferença significativa entre a média da retardância da camada interna da ZP em embriões com boa ou pobre qualidade morfológica (2.2 ± 0.9 nm; 2.3 ± 0.6 , respectivamente).

A causa biológica da variação (alta/positiva ou baixa/negativa) da birrefringência da ZP ainda é uma questão não esclarecida. A alta/positiva

birrefringência da camada interna da ZP poderia estar ligada a uma ótima formação dessa estrutura protéica, e consequentemente, de uma maturação oocitária perfeita (nuclear + citoplasmática). Além disso, especulou-se, também, que a integridade da estrutura da ZP poderia refletir, especificamente, uma MC ideal ¹².

Em vista destes fatos, procurou-se através de uma modelo de estudo com oócitos madurados “in vitro”, identificar qual a correlação entre a magnitude da birrefringência da ZP (escore positivo ou negativo) e o processo de maturação oocitário (nuclear e citoplasmática). Contudo, o material usado tem suas limitações: em primeiro lugar, porque é difícil a obtenção de óvulos em VG - os esquemas de estimulação ovariana procuram sempre induzir a produção de óvulos em metáfase II (a taxa de óvulos colhidos em VG no nosso serviço é de 7%); em segundo lugar, em algumas pacientes o número total de óvulos coletados é reduzido e, tal fato, inviabilizaria seu uso para pesquisa, desde que os óvulos maturados “in vitro” são fixados para a visualização das granulações citoplasmáticas; em terceiro lugar, os óvulos coletados por estimulação ovariana e maturados “in vitro” até o estágio de metáfase II poderiam não apresentar características citoplasmática idênticas aos obtidos em metáfase II logo após a coleta (maturados “in vivo”).

No presente trabalho, um total de aproximadamente 70% dos óvulos em VG atingiram o estágio de metáfase II com o uso de um meio de cultura simples, sem suplementação de gonadotrofinas ou esteróides. Em revisão sobre maturação

oocitária, Trounson *et al.*¹⁰⁰ relataram resultados variáveis (taxas de MN de 38% a 84%) obtidos na maturação “in vitro” de oócitos no estágio de VG, porém, provenientes de ciclos estimulados. Esses oócitos maturados “in vitro” possuem menor taxa de fertilização, mas similar qualidade embrionária quando comparados com oócitos obtidos em metáfase II maturados “in vivo”¹⁰¹.

Por outro lado, a birrefringência da ZP (positiva ou negativa) não se alterou com o evoluir da MN (VG até metáfase II); além disso, a correlação entre essas duas variáveis foi muito baixa (Tabela 3). Dessa forma, não se confirmou, a hipótese de uma possível correlação entre a presença de MC e uma positiva (alta) birrefringência da ZP (Tabela 7), pelo menos, no que diz respeito a oócitos maturados “in vitro”. Futuramente, caso se comprove que a birrefringência positiva da ZP é realmente um fator de seleção da saúde oocitária, e, conseqüentemente, embrionária, a hipótese da associação com a MN oocitária poderia não ser uma explicação biologicamente plausível.

A espessura da ZP também tem sido considerada uma variável ligada ao prognóstico da saúde ovular e embrionária. Assim sendo, existem evidências, na literatura, desta associação, como a observação da diminuição das taxas de implantação embrionária quando se constatava um aumento da espessura da ZP¹⁰². Entretanto, a variação da espessura da ZP foi o parâmetro que se correlacionou melhor com o sucesso em FIV^{97,103,95,104}. Dessa forma, variações $\geq$ 20% na espessura da ZP em embriões no 3º dia de desenvolvimento estariam

associadas com taxas de gestação de 50% contra 17.1% nos casos com variações da espessura da ZP < 20%¹⁰⁴.

Por outro lado, existem evidências de que a espessura total da ZP (TZP) pode não ser alterada após a fertilização mas uma ZP $\geq 22 \mu\text{m}$ poderia influenciar negativamente nos índices de fertilização^{105,94,93}. Na mesma linha de pensamento,¹¹ usando imagens obtidas por um microscópio equipado com um “PolScope”, observaram uma maior possibilidade ($p < 0.05$) de progressão para blastocisto (53.1% versus 21.9%), quando a camada interna da ZP do óvulo (antes do ICSI), possuía de 10-12 mm versus uma medida < 8mm. Contudo, as camadas externa e média da ZP do oócito não apresentaram valor prognóstico significativo.

No presente trabalho, a espessura total da ZP não se modificou durante a MN oocitária de VG até MII (Tabela 4). Além disso, a espessura total (esp-ZP) e a variação da espessura da ZP (VZP) não foram significativamente diferentes ($p = 0.71$ e $p = 0.67$, respectivamente) entre os óvulos com MC positiva (esp-ZP = $19,8 \pm 3,47 \mu\text{m}$; VZP = $14.5 \pm 8.8\%$) ou negativa (esp-ZP = $18,8 \pm 1,56 \mu\text{m}$; VZP = $15,5 \pm 8\%$) (Tabela 8). Esses dados sugerem que a esp-ZP parece ser estável em cultura pelo menos até a comprovação do processo de fertilização. A VZP não se modificou pelo menos com relação à MC.

O dismorfismo oocitário relacionado com as chamadas alterações AIC (presença vacúolos, grânulos e corpos refratários), especialmente quando se repete em ciclos subsequentes é considerado um marcador de insucesso da futura

ocorrência de uma gravidez ³¹. Desde que tem sido relatada uma associação significativa entre positiva (alta) birrefringência da ZP com o potencial de implantação embrionário em ciclos de ICSI ¹², seria interessante conhecer o grau de correlação entre esses dois parâmetros. Na Tabela 11, os dados demonstraram uma correlação fraca entre essas duas variáveis (birrefringência versus dismorfismo). Assim sendo, essa informação é difícil de ser interpretada porque as alterações de dismorfismo oocitário comumente são atribuídas a uma assincronia no processo de maturação oocitário²⁴, raciocínio semelhante ao empregado para explicar do ponto de vista biológico a ocorrência da negativa (baixa) birrefringência oocitária ¹². Por outro lado, a análise da espessura total da ZP não variou entre os oócitos com presença ou não de AIC (Tabela 12).

A fertilização oocitária é um parâmetro indireto de qualidade do oócito, pois o processo está, também, ligado as características dos espermatozóides que permitiriam sua penetração no oócito e a participação nos eventos bioquímicos e fisiológicos, tais como: o reconhecimento específico, adesão e fusão dos gametas. Entretanto, neste trabalho, todos os óvulos foram submetidos à técnica de ICSI, ficando comprovada, dentro de certos limites, a eficiência da ativação oocitária pelo reinício da meiose, descondensação do núcleo do espermatozóide, formação dos PN masculino e feminino ^{84,106}. Teoricamente, tais processos deveriam estar ligados a uma correta MC. Acreditando-se na hipótese de que a ausência de MC estivesse ligada à baixa birrefringência da ZP ¹², não seria errado pensar na possibilidade de uma correlação entre essas dois parâmetros (fertilização e BF-ZP). Entretanto, os dados (Tabela 15) evidenciaram uma

correlação fraca (“phi” = 0.063) entre fertilização e birrefringência da ZP. A espessura da ZP também não foi significativamente diferente entre os oócitos fertilizados ou não (Tabela 16).

A presença de FM tem sido associada com taxas elevadas de fertilização^{49,92,11,13}. Em alguns casos com embriões de alta qualidade^{88,11,13}. Petersen *et al.*¹⁰⁷ mostraram em um estudo de meta-análise uma maior taxa de fertilização (75.6% versus 61.5%, respectivamente; $p < 0.0001$; OR:1.79, 95% IC=1.57–2.05) quando o FM foi visualizado (4684 oócitos) versus a ausência da sua observação (1264 oócitos). Nesse trabalho, apesar da identificação do fenômeno de heterogeneidade, o cálculo realizado através do efeito ‘random’ confirmou uma maior taxa de fertilização quando o FM era visualizado ($p < 0.0001$; OR: 2.52, 95% IC=1.65-3.81). Por outro lado, os dados do presente trabalho identificaram a presença de FM em 51.7% dos oócitos em metáfase II após MN “in vitro” (VG até metáfase II). Entretanto, essa taxa é inferior aos valores de 92.7% e 91% relatados por^{5,6}, quando observaram oócitos em metáfase II, logo após a coleta, e com manobras de rotação no oócito, para facilitar a visualização do FM. Da mesma forma, continuam inferior as taxas descritas por Cohen *et al.*⁸, Rama Raju *et al.*¹¹ e Braga *et al.*¹³, que obtiveram valores menores de visualização (76%, 78% e 74.3%, respectivamente) mesmo com a aplicação da mesma manobra de rotação. Na Tabela 6, observou-se que foi idêntica ($p=0.46$) a frequência da presença ou não de FM na população de oócitos com evidência ou não de MC. Entretanto o número de oócitos estudados foi baixo; tal fato, poderia dificultar uma conclusão definitiva (número de oócitos

ideal, $n=250$, poder 80%, $\alpha=0.05$). No momento, a taxa de identificação de FM em óocitos com MC foi de 56.2% versus 38.4% de FM em óocitos sem MC. Por outro lado, seria interessante assinalar que não conseguimos identificar na literatura dados específicos sobre essa associação. A taxa geral de visualização do FM nos óocitos com ou sem MC foi de 48%. Na Tabela 12, foram analisados os óocitos em metafase II quanto à frequência da presença ou não de FM versus o dismorfismo oocitário. A taxa geral de visualização do FM foi de 60% e não houve correlação entre FM e dismorfismo. Por outro lado, também não houve correlação significativa (Tabela 14) entre a fertilização (presente ou ausente) e o FM (visualizado ou não) mas nesse grupo específico (rotineira avaliação dos óvulos antes da ICSI) a taxa geral de visualização do FM foi de 78.2%, semelhante a descrita acima pelos diferentes autores.

Finalmente, os resultados do presente trabalho demonstraram uma correlação fraca entre os parâmetros tradicionais de avaliação oocitária (maturação, dismorfismo e fertilização) com as características do FM e da ZP. Entretanto, a literatura sinaliza isoladamente para uma associação da qualidade oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário com o dismorfismo, a birrefringência da ZP, a variação do tamanho da ZP e a visualização do FM. Dessa forma, esses parâmetros poderiam identificar alterações em pontos diferentes da fisiologia oocitária, fato que explicaria a ausência de correlação, mas não excluiria o valor de suas informações.

Nesse momento, a criação de um escore de qualidade oocitária usando essas variáveis seria uma medida prudente. Em vista dos fatos relatados, sugerimos a criação de um escore seleção oocitária (ESO) com os parâmetros: dismorfismo oocitário, birrefringência da ZP, visualização do FM e variação da espessura da ZP $\geq 20\%$ (pontuação=1 quando o parâmetro analisado indicasse sua marca de saúde oocitária; pontuação=0 quando estivesse ausente; pontuação máxima do ESO = 4 pontos).

O ESO seria calculado antes da aplicação da técnica de ICSI, e, posteriormente, correlacionado com as características morfológicas embrionárias e as principais variáveis (taxas de implantação, gravidez, etc.) de controle do sucesso em Reprodução Assistida. Na literatura, não há escore envolvendo conjuntamente esses parâmetros de identificação da qualidade oocitária.

6- CONCLUSÕES

- A birrefringência e a espessura da zona pelúcida não variaram com o progredir da MN “in vitro”.
 - A visualização do fuso meiótico, a presença de positiva birrefringência e a espessura (total e variação) da zona pelúcida não se modificaram com a MC presente ou não (baseada em dados preliminares)
 - A visualização do fuso meiótico, a presença de positiva birrefringência e a espessura da zona pelúcida não se alteraram com o dismorfismo intracitoplasmático presente ou não.
 - A visualização do fuso meiótico, a presença de positiva birrefringência e espessura da zona pelúcida não variaram com a fertilização oocitária presente ou não.
 - Uma fraca correlação foi observada entre os parâmetros morfológicos tradicionais de avaliação oocitária (maturação, dismorfismo e fertilização) com as características do fuso meiótico e da zona pelúcida.
 - Desde que esses parâmetros podem ser responsáveis por identificar pontos biológicos diferentes do potencial de qualidade oocitária seria mais aconselhado sua utilização de forma conjunta através de um escore de qualidade oocitária.
-

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oldenbourg R. A new view on polarization microscopy. *Nature*. 1996;381:811–2
 2. Keefe D, Tran P, Pellegrini C, Oldenbourg R. Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. *Hum Reprod*. 1997;12:1250–52.
 3. Silva CS, Kapura K, Odenberg R, Keefe DL. The first polar body does not predict accurately the location of the metaphase II meiotic spindle in mammalian oocytes. *Fertil Steril*. 1999;71:719–21.
 4. Wang W, Meng L, Hackett RJ, Oldenbourg R, Keefe DL. The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertil Steril*. 2001; 75: 348.
 5. Cooke S, Tyler JPP, Driscoll GL. Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development. *Hum Reprod*. 2003;18:2397–405.
 6. 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;18:1289–93.
-

7. Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Grego E. Meiotic spindle visualization in living human oocytes. *Reprod BioMed Online*. 2005;10:192-98.
 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;19:649–54.
 9. Shen Y, Stalf T, Mehnert C, Eichenlaub-Ritter U, Tinneberg HR. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles *Hum Reprod*. 2005;20:1596-606.
 10. Madashi C, Bonetti CS, Braga DPAF, Pasqualotto FF, Iaconelli A, Borges E. Spindle imaging: a maker for embryo development and implantation. *Fertil Steril*. 2008; 90:194-198.
 11. 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;14:166–74.
 12. Montag M. Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles. *Reprod BioMed Online*. 2008;16:239-44
-

13. Braga DPAF, Figueira RCS, Rodrigues D, Madaschi C, Pasqualotto FF, Iaconelli A, et al. Prognostic value of meiotic spindle imaging on fertilization rate and embryo development in in vitro-matured human oocytes. *Fertil Steril*. 2008;90:429-33
 14. Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod*. 2002; 17: 1327–33.
 15. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update*. 2003; 9:251–62.
 16. Eichenlaub Ritter U, Schmiady H, Kentenich H, Soewarto D. Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum Reprod*. 1995;10:2343–9.
 17. Van Blerkom J, Henry G. Oocyte dismorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod*. 1992;7:379-90.
-

18. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade base on polar body, perivitteline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. Hum Reprod. 1997;12:1750-5.
 19. Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. Reprod BioMed Online. 2006;12:608-15.
 20. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, et al. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1998;13:3431-3.
 21. Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. What criteria for the definition of oocyte quality? Ann N Y Acad Sci. 2004;1034:132-44.
 22. Borini A, Lagalla C, Cattoli M, Cattoli M, Sereni E, Sciajno R, et al. Predictive factors for embryo implantation potential. Reprod BioMed Online. 2005;15:653-68.
 23. Chamayou S, Alecci C, Ragolia C, Storaci G, Maglia E, Russo E, et al. Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos Reprod BioMed Online. 2006;13:661-6.
-

24. Ebner T, Moser M, Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo potential after ICSI? *Reprod BioMed Online*. 2006;12:517–12.
 25. Kahraman S, Yakin K, Domez E, Samli H, Bahçe M, Cengiz G, et al. Relationship between cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 2000;15:2390-3.
 26. Khalili M, Mojibian M, Sultan A. Role of oocyte morphology on fertilization and embryo formation in assisted reproductive techniques. *Midle East Fertil Soc J*. 2005;10: 72-7.
 27. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, et al. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertil Steril*. 2005;83:1635-40.
 28. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1996;11:595-7.
 29. Alikani M, Palermo G, Adler A, Bertoli M, Black M, Cohen J. Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic oocytes. *Zygote*. 1995;3:283-8.
-

30. Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *Microsc ResTech*. 1990;16:324-46.
 31. Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H. The relationship between pregnancy outcome endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod*. 2004; 19:1591-7.
 32. Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S, Cruz M, Casper RF. Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. *Hum Reprod*. 2001;16:2118-23.
 33. Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod*. 1995;10:415-24.
 34. Van Blerkom J. The influence of intrinsic and extrinsic factors on the developmental potential and chromosomal normality of the human oocyte. *J Soc Gynecol*. 1996;3:3-11.
 35. Payne D, Flaherty SP, Jeffrey R, Warnes GM, Matheus CD. Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1994;9:2051-7.
-

36. Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD. Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1995;10:2623-9.
 37. Mahutte NG, Arici A. Failed fertilization: is it predictable? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003;15:211-8.
 38. Pickering SJ, Johnson MH, Brude PR, Houliston E. Cytoskeletal organization in fresh aged and spontaneously activated human oocytes. *Hum Reprod.* 1988;3:978-89.
 39. Eichenlaub-Ritter U, Shen Y, Tinneberg HR. Manipulation of oocyte: possible damage to spindle apparatus. *Reprod BioMed Online.* 2002;5:117-24.
 40. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Fertilization and early embryology: Influence of maternal age on meiotic spindle assembly oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod.* 1996;11:2217-2.
 41. Volarcik K, Sheean L, Goldfarb J, Wood L, Abdul-Karim FW, Hunt H. The meiotic competence of in-vitro matured human oocyte is influenced by donar age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. *Hum Reprod.* 1998;13:154- 60.
-

42. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant ARM, Currie JRM. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril*. 1990;54:102-8.
 43. Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes. *Biol Reprod*. 1994;50:103-10.
 44. Almedia PA, Bolton VY. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organization and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote*. 1995;3:357-65
 45. Wang W, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL. Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril*. 2002;77: 1274-6.
 46. Sun XF, Wang WH, Keefe DL. Overheating is detrimental to meiotic spindles within in vitro matured human oocytes. *Zygote*. 2004;12:65-70.
 47. Eichenlaub Ritter U, Chandley AC, Gosden R. Alteration to the microtubular cytoskeleton and increased disorder of chromosome alignment in spontaneously ovulated mouse oocyte aged in vitro: an immunofluorescent study. *Chromosoma*. 1986;94:337-45.
-

48. Eichenlaub Ritter U, Stah A, Lucian JM. The microtubular cytoskeleton and chromosomes of unfertilized human oocytes aged in vitro. *Hum Genet.* 1988;80:259–64.
 49. Shen Y, Stalf T, Mehnert C, De Santis L, Cino I, Tinnerber HR, et al. Light retardance by human oocyte spindle is positively related to pronuclear score after ICSI. *Reprod BioMed Online.* 2006;12:737–51
 50. Baranska W, Konwinski M, Kujawa M. Fine structure of the zona pellucida of unfertilized egg cells and embryos. *J Exp Zool.* 1975;192:193–202.
 51. Bercegeay S, Jean M, Lucas H, Barriere P. Composition of human zona pellucida as revealed by SDS–PAGE after silver staining. *Mol Reprod Dev.* 1995;41:355–9.
 52. Green DP. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod.* 1997;2:147–56.
 53. Prasad SV, Skinner SM, Carino C, Wang N, Cartwright J, Dunbar BS. Structure and function of the proteins of the mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Organs.* 2000;166:148–64.
 54. Herrler A, Beier HM. Early embryonic coats: morphology, function, practical applications. An overview. *Cells Tissues Organs.* 2000;166:233–46.
-

55. Carino C, Prasad S, Skinner S, Dunbar B, Chirinos M, Schwoebel E, et al. Localization of species conserved zona pellucida antigens in mammalian ovaries. *Reprod BioMed Online*. 2002;4:116–26.
 56. Epifano O, Liang LF, Familiar M, Moos Jr MC, Dean J. Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development*. 1995;121:1947–56.
 57. Soyol SM, Amleh A, Dean J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*. 2000; 127:4645–54.
 58. Sinowatz F, Topfer-Petersen E, Kolle S, Palma G. Functional morphology of the zona pellucida. *Anat Histol Embryol*. 2001;30:257–63.
 59. Bogner K, Hinsch KD, Nayudu P, Konrad L, Cassara C Hinsch E. Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) ovary. *Mol Hum Reprod*. 2004;10:481–8.
 60. Gook D, Martic M, Borg J, Edgar DH. Identification of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. *Hum Reprod*. 2004; 19 Supp 1: 140.
-

61. Familiari G, Nottola SA, Macchiarelli G, Micara G, Aragona C, Motta PM. Human zona pellucida during in vitro fertilization: an ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbohydrazide. *Mol Reprod Dev.* 1992; 32:51–61.
 62. Wassarman P, Chen J, Cohen N, Litscher E, Liu C, Qi H, et al. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J Exp Zool.* 1999; 285:251–8.
 63. Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenet Genome Res.* 2004; 105:228–34.
 64. Oehninger S. Biochemical and functional characterization of the human zona pellucida. *Reprod BioMed Online.* 2003;7:641–8.
 65. Nikas G, Paraschos T, Psychoyos A, Handyside AH. The zona reaction in human oocytes as seen with scanning electron microscopy. *Hum Reprod.* 1994;49:2135–8
 66. Moos J, Faundes D, Kopf GS, Schultz RM. Composition of the human zona pellucida and modifications following fertilization. *Hum Reprod.* 1995;10:2467–71.
 67. Chiu PC, Wong BS, Lee CL, Pang RT, Lee KF, Sumitro SB, et al. Native human zona pellucida glycoproteins: purification and binding properties. *Hum Reprod.* 2008;6:1385-93.
-

68. Wassarman PM. Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:415–42.
 69. Qi H, Williams Z, Wassarman PM. Secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins by growing mouse oocytes microinjected with epitope-tagged cDNAs for mZP2 and mZP3. *Mol Biol Cell.* 2002;13: 530–41.
 70. Jimenez-Movilla M, Aviles M, Gomez-Torres MJ, Fernandez-Colom PJ, Castells MT, De Juan J, et al. Carbohydrate analysis of the zona pellucida and cortical granules of human oocytes by means of ultrastructural cytochemistry. *Hum Reprod.* 2004;19:1842–55.
 71. Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, et al. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod.* 2004;19:1580–6.
 72. Albertini DF, Rider V. Patterns of intercellular connectivity in the mammalian cumulus-oocyte complex. *Microsc Res Tech.* 1994; 27: 125–33.
 73. Motta PM, Makabe S, Naguro T, Correr S. Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. *Arch Histol Cytol.* 1994;57:369–94.
-

74. Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *BioEssays*. 1991;13:569–74.
 75. Webb RJ, Bains C, Cruttwell C, Carroll J. Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction*. 2002; 123:41–52.
 76. Albertini DF, Barrett SL. Oocyte–somatic cell communication. *Reproduction*. 2003;61(Suppl): 49–54.
 77. Greve JM, Wassarman PM. Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol*. 1985;181:253–24.
 78. Rankin T, Talbot P, Lee E Dean J. Abnormal zonae pellucida in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development*. 1999;126: 3847–55.
 79. Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, Kruger TF, Rosenwaks Z, Hodgen GD. The hemizona assay (HZA): developmet of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril* 1988; 49:688-97.
 80. Tsubamoto H, Hasegawa A, Nakata Y, Naito S, Yamasaki N, Koyama K. Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biol Reprod*. 1999;61:1649–54.
-

81. Miller DJ, Shi X, Burkin H. Molecular basis of mammalian gamete binding. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:37–73.
 82. Wassarman PM. Sperm receptors and fertilization in mammals. *Mt Sinai J Med.* 2002;69:148–55.
 83. Hoodbhoy T, Dean J. Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction.* 2004; 127:417–22.
 84. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction.* New York: Raven Press; 1994. p. 189–317.
 85. Liu C, Litscher ES, Mortillo S, Sakai Y, Kinloch RA, Stewart CL, et al. Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:5431–6.
 86. Rankin TL, O'Brien M, Lee E, Wigglesworth K, Eppig J, Dean J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development.* 2001; 128:1119-26.
 87. 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;16:1464–8.
-

88. Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son W Y, Yoon S Hy, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using Polscope enables the prediction of embryonic development competence after ICSI. *Hum Reprod.* 2003;18:817–20.
 89. Konc J, Kanyo K, Cseh S. Visualization and examination of the meiotic spindle in human oocytes with Polscope. *J Assist Reprod Genet.* 2004;21:349–53.
 90. Madaschi Reis C, Braga DPFA, Rodrigues D, Bonetti TCS, Iaconelli Jr A, Pasqualoto CV, et al. Embryo development and Octax ICSI guard spindle image *Hum Reprod.* 2006; 21Suppl 1:i22-3.
 91. Montag M, Schimming T, van der Van H. Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. *Reprod BioMed Online.* 2006;12:442–6.
 92. Taylor TH, Gitlin S, Wrigth G, Mitchell-Leef D, Kort HI, Nagy ZP. The meiotic spindle of human oocytes as viewed under the oosight and its relationship to chromosomal aneuploidy of subsequent embryo *Hum Reprod.* 2006; 21Suppl.1:i23.
 93. Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertil Steril.* 2004;81:850–6.
-

94. Bertrand E, Van den Bergh M, Englert Y. Clinical parameters influencing human zona pellucida thickness. *Fertil Steril*. 1996;66:408-11.
 95. Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. *Hum Reprod*. 2001;16:2166–70.
 96. Cherr G, Drobins E, Katz D. Localization of cortical constituents before and after exocytosis in hamster egg. *J Exp Zool*. 1998;26:81-93.
 97. Cohen J, Inge KL, Suzman M, Wiker SR, Wright G. Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril*. 1989;51:820-7.
 98. Gook DA, Edgar DH, Borg J, Martic M. Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. *Hum Reprod*. 2008;23:394-402.
 99. Çiray NH. Preliminar study of embryo development following assessment of male and female gametes. *Reprod BioMed Online*. 2008;16:875-80.
 100. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction*. 2001;121:51-75.
-

101. De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Van Steirteghem A. *In vitro* matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1999; 14:1859-63.
 102. Gabrielsen A, Bhatnager PR, Petersen K, Lindenberg S. Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. J Assist Reprod Genet. 2000;17:323-8.
 103. Palmstierna M, Murkes D, Csemiczky G, Andersson O, Wramsby H. Zona pellucida thickness variation and occurrence of visible mononucleated blastomeres in preembryos are associated with a high pregnancy rate in IVF treatment. J Assist Reprod Genet. 1998;15:70-5.
 104. Sun YP, Xu Y, Cao T, Su YC, Guo YH. Zona pellucida thickness and clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization. Int J Gynaecol Obstet. 2005;89:258-62.
 105. Bertrand E, Van Den Bergh M, Englert Y. Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? Hum Reprod. 1995;10:1189-93.
 106. Ciapa B, Chiri S. Egg activation: upstream of the fertilization calcium signal. Biol Cell. 2000; 92:215-33.
-

107. Petersen CG, Oliveira JBA, Mauri A, Massaro AL, Baruffi R, Pontes AG, et al. Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcome: a meta-analysis. *Reprod BioMed Online*. In press 2009.
-

Capítulo 99

Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcomes: a meta-analysis

**Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes
and ICSI outcomes: a meta-analysis**

CG Petersen^{1,2}, JBA Oliveira¹, AL Mauri^{1,2}, FC Massaro¹, RLR Baruffi¹, A Pontes³, JG Franco Jr.^{1,3,4}

¹Center for Human Reproduction Prof. Franco Junior, Ribeirão Preto, SP, Brazil

²Postgraduate Fellow, Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, SP, Brazil

³Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, SP, Brazil

⁴Correspondence to:

José Gonçalves Franco Jr.

Center for Human Reproduction Prof. Franco Junior

Av. Prof. João Fiusa, 689 – Zip Code 14025-310

Ribeirão Preto – São Paulo – Brazil

Phone/FAX: 55-16- 3911-1100

E-mail: crh@crh.com.br or franco@crh.com.br

ABSTRACT

The objective of this meta-analysis was to investigate the influence of meiotic spindle visualization in human oocytes on ICSI outcomes. Search strategies included on-line surveys of databases. The fixed effect was used for odds ratio. Ten trials fulfilled the inclusion criteria. According to meta-analysis study, the results showed statistically significant higher fertilization rate ($P<0.0001$) when meiotic spindle was viewed than when it was not. Moreover, percentage of pronuclear stage embryos with good morphology ($P=0.003$), cleavage rate ($P<0.0001$) percentage of day-3 top quality embryos ($P=0.003$) and percentage of embryo that reached blastocyst stage ($P<0.0001$) were statistically significantly better among embryos derived from oocytes in which meiotic spindle was viewed compared with those in which meiotic spindle was not observed. However, these differences were not observed in the clinical pregnancy or implantation rates. This observation has clinical relevance mainly in countries where there is a legal limit on the number of oocytes to be fertilized. However, additional controlled trials are needed to further confirm these results.

Key Words: human oocyte; ICSI; meiotic spindle; meta-analysis

INTRODUCTION

In assisted reproduction, gamete selection with the aim of achieving better clinical results is an important task for embryologists. This question has particular relevance when ethical and/or legal considerations limit embryo selection after fertilization and, consequently, the formation of supernumerary embryos. Extracellular oocyte morphological characteristics, such as cumulus oophorus, polar body, zona pellucida, and intracellular characteristics (granulations and cytoplasmic inclusions) have been related to fertilization, cleavage, embryo development and clinical outcomes (Coticchio *et al.*, 2004; Borini *et al.*, 2005; Balaban and Urman 2006; Chamayou *et al.*, 2006; Ebner *et al.*, 2006;).

Among the intracellular characteristics, meiotic spindle assessment in mature oocytes has awakened high interest. The first papers about the meiotic spindle supply extensive information on cellular division function. However, the methodology for viewing the spindle, confocal microscopy, was based on fixation and consequently, its routine application in assisted reproduction procedures and in spindle dynamic studies were frustrated due to the impossibility of applying this method in living oocytes (Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2002; Coticchio *et al.*, 2004; Borini *et al.*, 2005). More recently, with the appearance of polarized light microscopy and an integrated imaging processor software, it has been possible to visualize the meiotic spindle in living oocytes by

a non-invasive method, preserving cell viability (Wang *et al.*, 2001a,b; Cooke *et al.*, 2003; Moon *et al.*, 2003; Rienzi *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2004, Konc *et al.*, 2004; Chamayou *et al.* 2006; Montag *et al.*, 2006; Shen *et al.*; 2006; Taylor *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2007; Rama Raju *et al.*, 2007; Varghese *et al.*, 2007; Madaschi *et al.*, 2008).

The meiotic spindle, by controlling chromosomal movements throughout the different stages of meiosis, plays a key role in the successful completion of meiosis. Disturbances of meiotic spindles have been suggested as predisposing oocytes to perturbation of chromosomal segregation and subsequent aneuploidy, maturation arrest, an increased incidence of cell death and subsequent lower fertilization rates (Battaglia *et al.*, 1996; Hardarson *et al.*, 2000; Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2002; Cooke *et al.*, 2003; Varghese *et al.*, 2007). In various studies, oocytes in which the meiotic spindles were visualized have demonstrated a significant increase in ICSI outcomes such as fertilization rates (Wang *et al.*, 2001a; Rienzi *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006; Madaschi *et al.*, 2008; Rama Raju *et al.*, 2007) and embryo development (Wang *et al.*, 2001a; Cohen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006; Madaschi *et al.*, 2008; Rama Raju *et al.*, 2007). However, other studies have not confirmed this correlation (Moon *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2007). The present meta-analysis aimed to investigate the relationship between meiotic spindle presence in human oocytes and in ICSI *in vitro* and *in vivo* outcomes.

MATERIALS AND METHODS

Criteria for considering studies for this meta-analysis

All published and ongoing controlled trials compare *in vitro* and clinical ICSI outcomes between oocytes in which the meiotic spindle was visualized and those whose meiotic spindle was not seen. Only trials that analysed fresh and *in vivo* matured oocytes were included.

Types of outcome measures

The outcome measures used for this meta-analysis were fertilization rate, embryo development (percentage of pro-nuclear (PN)-stage embryos with good morphology, cleavage rate, percentage of day-3 top quality embryos and percentage of embryos reaching blastocyst stage), implantation rate and clinical pregnancy rate per transfer.

Identification of studies

Search strategies included online surveys of databases (MEDLINE, EMBASE, Science Citation Index, Cochrane Controlled Trials Register and OVID) from 1990 to 2008. There was no language restriction. The following Medical Subject Headings and text words were used: meiotic spindle, spindle view, spindle, polarization microscope, polarization light microscopy, PolScope and ICSI guard

Search results

Among the 15 potentially relevant studies retrieved from online databases, a total of ten trials fulfilled the inclusion criteria (Wang *et al.*, 2001a; Moon *et al.*, 2003; Rienzi *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2004; Chamayou *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2007; Rama Raju *et al.*, 2007; Madaschi *et al.*, 2008). A typical flow schematic for the selection process is shown in Figure 1.

Description of the studies included:

All the studies used PolScope except for Madaschi *et al.* (2008).

Wang *et al.* (2001a) examined the development of human oocytes with or without meiotic spindles, imaged before ICSI. Oocytes were obtained from stimulated ovaries of consenting patients undergoing oocyte retrieval for ICSI. After imaging and ICSI, oocytes with or without spindles were cultured separately for examination of fertilization and embryo development. A total of 1544 oocytes from 136 cycles were examined and inseminated by ICSI. Spindles were imaged in 82% of oocytes. After ICSI, more oocytes ($P<0.05$) with spindles (69.4%) fertilized normally, forming 2 PN, than oocytes without spindles (62.9%). At day 3, more oocytes ($P<0.01$) with spindles (66.3%) had developed to cell stages 4–11 than oocytes without spindles (55.4%). Significantly more ($P<0.001$) oocytes with spindles developed to morula and blastocyst by day 5 (51.1 versus 30.3%) and day 6 (53.2 versus 29.3%) compared to oocytes without spindles.

Moon *et al.* (2003) investigated the relationship between the presence/location of the spindle in metaphase II (MII) oocytes and developmental competence of embryos *in vitro*. The spindles in 626 MII oocytes were examined and divided into six groups based on the presence or absence of spindles and the angle between the spindle and the first polar body. Meiotic spindles were imaged in 523 oocytes (83.5%), while 103 (16.5%) did not have a visible spindle. The rate of normal fertilization was similar in the oocytes with spindles regardless of spindle position (82.2% versus 75.7%).

Rienzi *et al.* (2003) analysed the relationship between the degree of meiotic spindle deviation from the first polar body location and ICSI outcome. Oocytes were divided into four groups according to the angle of meiotic spindle deviation from the polar body position. The angles of deviation were 0–5°, 6–45°, 46–90° and >90° for groups I to IV, respectively. The rate of normal fertilization was higher in the oocytes with spindles regardless of spindle position (74.8% in oocytes with spindle versus 33.3% in oocytes without spindle). The rates of normal (2 PN) and abnormal (1PN or >2PN) fertilization did not differ among groups I, II and III. Nevertheless, the rate of normal fertilization was lower among oocytes in which the meiotic spindle deviation angle was >90° (50%); this led to an increased proportion of trippronucleated zygotes that failed to extrude the second polar body. The meiotic spindle was not detected in only 9% of oocytes, and these showed a higher incidence of fertilization abnormalities than did oocytes in which the spindle was detected.

Cohen *et al.* (2004) aimed to investigate meiotic spindle assembly in correlation with time elapsed after hCG administration, and to determine whether spindle imaging may serve to indicate the likelihood of fertilization and embryo cleavage. Seven hundred and seventy MII oocytes from 103 couples who were being treated for male infertility were imaged prior to sperm injection. A spindle was imaged in a significantly higher number of oocytes from ≥ 38 h after hCG administration compared with those in the < 38 h group (78.1–81.5% versus 61.6%; $P < 0.001$). The fertilization rate in oocytes with a visible spindle was statistically higher compared with oocytes in which a spindle could not be detected (70.4% versus 62.2%; $P = 0.035$). There was no relationship between spindle imaging and embryo cleavage on day 3.

Chamayou *et al.* (2006) studied the validity of oocyte morphological criteria such as ooplasm texture, perivitelline space (PVS) size, PVS granulation absence/presence, first polar body shape, and meiotic spindle presence/absence as predictive factors in clinical ICSI outcomes. No relationship was found between meiotic spindle presence or absence and clinical pregnancy per transfer (20.8% versus 17.5%; $P > 0.05$) or implantation rates (11.9% versus 9.7%, $P > 0.05$) after ICSI.

Shen *et al.* (2004) aimed this study at improving the non-invasive strategies for selection of high quality human oocytes prior to ICSI by analysing, independently at two IVF centres, the optical properties of the spindle apparatus quantitatively based on the mean magnitude of light retardance by the oocyte

spindle. In one centre, all MII oocytes were fertilised. Accordingly, all fertilized oocytes could be analysed for pronuclear score after ICSI. Fertilization occurred in 91.5% (676 of 739) of the oocytes possessing a spindle versus 73.4% (116 of 158) in the group without a spindle, significantly different from each other ($P<0.001$). The fate of 792 fertilised oocytes with (676) and without spindle (116) was assessed further for development into a high or low PN stage embryo quality. The proportion of high quality PN-stage embryos was significantly higher for oocytes possessing a birefringent spindle compared to oocytes without a spindle (34.2% versus 19.9%; $P<0.001$).

Taylor *et al.* (2006) investigated whether meiotic spindle positioning relative to the polar body and spindle retardance in MII human oocytes constitutes an effective predictor of aneuploidy. The study was conducted in a prospective randomised manner involving 26 patients undergoing ICSI with preimplantation genetic diagnosis (PGD) for aneuploidy screening. When a spindle was present, 109 out of 126 (86.5%) were fertilised, which was significantly higher when compared to fertilization of oocytes that did not show a spindle, 10 out 17 (58.8%; $P=0.0099$).

Rama Raju *et al.* (2007) analysed the relationship of meiotic spindle and zona pellucida characteristics to embryonic development potential. A total of 205 oocytes from 25 patients were examined. A meiotic spindle was visualized in 160 oocytes (78.0%), but could not be found in the remaining 45 oocytes (22.0%). Significantly more oocytes with visible spindles were fertilised and

progressed to blastocysts compared with those without visible spindle (82.5% versus 31.1% $P<0.05$ and 48.5% versus 14.3% $P<0.05$, respectively).

Fang *et al.* (2007) aimed to investigate the relationship between spindle location and embryonic development of *in vivo* and *in vitro* matured human oocytes. The spindles of 134 *in vivo* matured oocytes were examined at the time of ICSI. The spindles were visualised in 83.6% (112/134) and not visualised in 16.4% (22/134) of the oocytes. The normal fertilization rate was similar between spindle (75.9%, 85/112) and non-spindle-group (63.6%, 14/22 $P=0.35$). The cleavage rate was not significantly different between the groups ($P>0.05$). The rate of high quality embryos was also not significantly different between the groups ($P>0.05$).

Madaschi *et al.* (2008) examined whether the presence of meiotic spindles in living human oocytes can be used as a predictive factor associated with embryo morphology to allow embryo selection before transfer and its association with IVF outcomes. A total of 1,097 MII oocytes from 157 women were screened by using the polarisation imaging software module Octax ICSI Guard[®] (Octax, Herborn, Germany) at the time of ICSI. The meiotic spindles were detected in 689 (62.8%, spindle-detected group), and spindles were not visualised in 408 (32.7%, spindle-non-detected group). The normal fertilization rate was significantly higher in the spindle-detected group (66.5%) than spindle-non-detected group (58.6%; $P=0.009$). Although the percentage of embryos with good PN morphology had been similar between the two groups (spindle-detected

group, 11.7%; spindle–non-detected group, 9.3%; $P=0.508$), the rate of early-cleaved embryos was significantly higher in the spindle-detected group than in the spindle–non-detected group (50.9% and 32.6%, respectively; $P=0.037$). When only embryos from the spindle-detected group were selected for transfer, the pregnancy and implantation rates were 44.4% and 23.0%, and when only embryos from the spindle–non-detected group were transferred, those respective rates were 18.2% and 8.7% ($P=0.029$ and $P=0.022$, respectively).

Statistical analysis

Data management and analysis were conducted using the StatsDirect statistical software (Cheshire, UK). The fixed effect model was used for odds ratio (OR). If there was statistical heterogeneity, an additional analysis was performed using the random effects model. Fixed effect effectiveness was evaluated by the Mantel-Haenszel method. A confidence interval for the Mantel-Haenszel OR in StatsDirect was calculated using the Robins, Breslow and Greenland variance formula. For random effect, a confidence interval for OR was calculated using the DerSimonian-Laird formula. A chi-squared test statistic was used with its associated probability that the pooled OR was equal to 1. The measure of heterogeneity (non-combinability) was evaluated by Cochran's Q, the Breslow-Day and I^2 (Higgins *et al.*, 2003) tests. A non-significant result (i.e. lack of heterogeneity) indicates that no trial has an OR that is significantly worse or better than the overall common OR obtained by pooling the data. Since a fixed

effects model has been employed herein, it is important to acknowledge that inferences refer only to the particular studies included in the analysis. Meta-analysis used in this manner is simply a device to pool the information from the various studies to provide a composite finding, but only for those studies. Since many of the preceding analyses contained only two or three studies, it was decided to derive the inferences from a fixed effects model. In the alternative random effect model, the individual studies are regarded as a random sample from the (infinite) population of studies. Global inferences would then be permissible, but the random errors used would need to reflect inter-study variation (heterogeneity).

RESULTS

Outcomes

-Fertilization rate (Figure 2)

Nine studies were included (Wang *et al.*, 2001a; Moon *et al.*, 2003; Rienzi *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006, Fang *et al.*, 2007; Rama Raju *et al.*, 2007; Madaschi *et al.*, 2008). The fertilization rate was statistically significant higher in the group of oocytes in which meiotic spindle was viewed (75.6%; 3543/4684) than in the group of oocytes that did not show meiotic spindle (61.5%; 777/1264) ($P<0.0001$; OR: 1.79, 95% CI 1.57, 2.05). There was heterogeneity in this comparison (Breslow-Day=63.6, df=8, $P<0.0001$; Cochran Q=59.7, df=8, $P<0.0001$; $I^2=86.6\%$). Using the random effect model, pooling of the results also showed a statistically significantly higher fertilization rate when a meiotic spindle was viewed ($P<0.0001$; OR: 2.52, 95% CI 1.65, 3.81).

-Embryo development

PN-stage embryo morphology (Figure 3)

Two studies were included (Shen *et al.*, 2006; Madaschi *et al.*, 2008). The percentage of embryos with good PN morphology was statistically significantly higher among embryos derived from oocytes in which meiotic spindle was viewed (25.1%; 285/1134) than between embryos derived from oocytes that did not present a meiotic spindle (12.7%; 45/355) ($P=0.003$; OR:

1.71; 95% CI 1.20, 2.44). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day=1.64, df=1, $P=0.19$; Cochran $Q=1.64$, df=1, $P=0.19$).

Cleavage rate (Figure 4)

Three studies were included (Wang *et al.*, 2001a; Fang *et al.*, 2007, Madaschi *et al.*, 2008). The cleavage rate was statistically significantly higher among embryos derived from oocytes in which meiotic spindle was viewed (63.1%; 897/1422) compared to embryos derived from oocytes not showing meiotic spindle (43.9%; 188/428) ($P<0.0001$; OR: 1.85, 95% CI 1.47, 2.32). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day=1.63, df=2, $P=0.44$; Cochran $Q=1.63$, df=2, $P=0.44$; $I^2=0\%$).

Day 3 embryo-stage quality (Figure 5)

Three studies were included (Wang *et al.*, 2001a; Cohen *et al.*, 2004, Fang *et al.*, 2007). The percentage of embryos classified on day 3 as top quality was statistically higher among those derived from oocytes in which meiotic spindle was viewed (37.3%; 381/1022) than the ones derived from oocytes not presenting meiotic spindle (28%; 56/200) ($P=0.003$; OR: 1.70, 95% CI 1.20, 2.42). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day=0.13, df=2, $P=0.93$; Cochran $Q=0.13$, df=1, $P=0.93$; $I^2=0\%$).

Number of embryos that reached blastocyst stage (Figure 6)

Two studies were included (Wang *et al.*, 2001a; Rama Raju *et al.*, 2007). The percentage of embryos that attained the blastocyst stage (on day 5) was statistically significantly higher among those derived from oocytes in which

meiotic spindle was viewed (50.7%; 376/742) compared to the ones from oocytes that did not show meiotic spindle (28.6%; 38/133) ($P < 0.0001$; OR: 2.61, 95% CI 1.74, 3.91), a comparison without heterogeneity (Breslow-Day=1.14, $df=1$, $P=0.28$; Cochran $Q=1.10$, $df=1$, $P=0.29$).

-Implantation rate (Table 7)

Two studies were included (Chamayou *et al.*, 2006; Madaschi *et al.*, 2008). The implantation rate was not significantly different between transferred sets with only embryos derived from oocytes in which meiotic spindle was viewed (15.4%, 64/415) versus sets containing only embryos from oocytes showing no meiotic spindle (9.8%, 24/246) ($P = 0.11$; OR = 1.56, 95% CI 0.94, 2.59). There was no heterogeneity in this comparison (Breslow-Day=1.50, $df = 1$, $P=0.22$; Cochran $Q=1.49$, $df=1$, $P=0.22$).

-Clinical pregnancy rate per transfer (Figure 8)

Two studies were included (Chamayou *et al.*, 2006; Madaschi *et al.*, 2008). The clinical pregnancy rate per transfer was not significantly different between sets with only embryos derived from oocytes in which meiotic spindle was viewed (28.5% 55/193) versus embryo sets derived exclusively from oocytes presenting no meiotic spindle (17.6%, 21/119) ($P = 0.11$; OR = 1.65, 95% CI 0.93, 2.93), a comparison without heterogeneity (Breslow-Day=2.42, $df = 1$, $P=0.12$; Cochran $Q=2.36$, $df=1$, $P=0.12$).

DISCUSSION

As part of the ongoing search for markers that predict higher success rates in IVF/ICSI cycles by assessment of oocyte maturation and quality, it was suggested that meiotic spindle imaging could contribute valuable information. Different studies reported that many oocytes that had expelled the first polar body immediately after oocyte collection also show the meiotic spindle (Wang *et al.*, 2001a,b; Moon *et al.*, 2003; Rienzi *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2004; Konc *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2006; Rama Raju *et al.*, 2007; Madaschi *et al.*, 2008). In most of the cases, the meiotic spindle presence is associated with higher fertilization rates (Wang *et al.*, 2001a,b; Rienzi *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006; Rama Raju *et al.*, 2007, Madaschi *et al.*, 2008), and in some cases, with higher embryo development (Wang *et al.*, 2001a, Moon *et al.*, 2003, Rama Raju *et al.*, 2007) and pregnancy rates (Madaschi *et al.*, 2008). In this meta-analysis, significantly higher fertilization was found in 4684 oocytes where a meiotic spindle was viewed compared with 1264 oocytes where no meiotic spindle was observed (75.6% versus 61.5% respectively; $P<0.0001$; OR: 1.79, 95% CI 1.57, 2.05). This result indicates that the presence of a meiotic spindle predicts a higher fertilization rate. However, the result of the analysis was impaired due to the heterogeneity observed among some studies (Breslow-Day=63.6, df=8, $P<0.0001$; Cochran Q=59.7, df=8, $P<0.0001$; $I^2=86.6\%$). On the other hand, when the data were pooled using a random effects model the

difference in fertilization rate was still significant ($P < 0.0001$; OR: 2.5, 95% CI 1.65, 3.81).

In addition, better results were observed among embryos derived from oocytes in which meiotic spindle was viewed than among those from oocytes not showing a meiotic spindle in the following parameters: cleavage rate ($P < 0.0001$; OR: 1.85, 95%CI 1.47, 2.32), percentage of PN-stage embryos with good morphology ($P = 0.003$; OR: 1.71, 95%CI 1.20, 2.44), percentage of day-3 top quality embryos ($P = 0.003$; OR: 1.70, 95%CI 1.20, 2.42) and percentage of embryos reaching the blastocyst stage ($P < 0.0001$; OR: 2.61, 95%CI 1.74, 3.91). These outcomes showed a strong relationship between meiotic spindle identification and better embryo development. However, these differences were not observed in the implantation rate ($P = 0.11$; OR = 1.56, 95% CI 0.94, 2.59) or clinical pregnancy per transfer rate ($P = 0.11$; OR = 1.65, 95% CI 0.93, 2.93).

The difference in the percentage of oocytes with spindle meiotic birefringence among the studies (minimum of 62.8% and maximum of 91%) can be related to a variation in the population or to ovarian stimulation protocols. Defects in protein complex, low energy supply or disturbances in the signalling pathway may also be involved in disturbances of spindle structure (Eichenlaub-Ritter et al 2002). However, as thermal control stabilizes the meiotic spindle, this difference can be related to the precision of how this temperature control was performed during oocyte collection, culture or microinjection (Wang *et al.*, 2002, Cooke *et al.*, 2003, Rienzi *et al.*, 2003). Other environmental changes such as pH

and culture conditions may also compromise spindle visualisation (Hu *et al.*, 2001, Roberts *et al.*, 2002).

On the other hand, the time at which oocytes were analysed can also contribute to whether or not the spindle is visualised. Cohen *et al.* (2004) showed that the percentage of oocytes with a visible spindle is higher in cases in which the spindle evaluation was performed at least 38 hours after the hCG administration, compared to those whose spindle evaluation was performed earlier (81.5% vs. 61.6%, respectively). Montag *et al.* (2006) showed that during the transition from metaphase I to metaphase II, the spindle completely disappears for approximately 40–60 min. This fact indicates that the absence of the spindle at least in some human MII oocytes is more likely an indicator of the physiological progression through an important developmental stage of meiosis rather than a cellular disturbance. Thus, the poorer ICSI outcomes among oocytes not showing a spindle could simply indicate an incorrect timing of ICSI.

Sometimes the spindles became visible only after oocyte rotation, when the orientation of microtubules had become favourable for the visualization. Therefore, differences in this technique may be responsible for the high degree of spindle absence. By rotating the oocytes with the ICSI micropipette around the axis connecting the centre of the oocyte to the first polar body during the attempts at spindle visualisation, Cooke *et al.* (2003) and Rienzi *et al.* (2003) detected the spindle in up to 92.7% and 91% of oocytes examined, respectively. However, Cohen *et al.* (2004), Rama Raju *et al.* (2007) and Madaschi *et al.* (2008) reported

lower rates of spindle visualization (76%, 78% and 62.8, respectively) despite rotating the oocytes. On the other hand, some authors have not mentioned how many rotations of the oocyte were viewed to determine presence or absence of a spindle (Wang *et al.*, 2001a, b, Wang and Keefe 2002, Moon *et al.*, 2003).

Nuclear oocyte maturation is determined by the absence of the germinal vesicle and the presence of the first polar body. Changes in the maturation promotion factor activity, c-mos kinases and mitogen-activated protein (MAP) kinases control cellular mitosis by promoting chromosomal condensation, germinal vesicle collapse and spindle formation (Eichenlaub-Ritter and Peschke 2002, Cohen *et al.*, 2004). The lower fertilization rate demonstrated in oocytes without spindle refringence can be attributed to oocyte immaturity. On the other hand, a considerable number of these oocytes were fertilised (61.5% of all studies included in this meta-analysis). Plausible explanations for this number include the occurrence of technical failures during spindle visualisation (inexperienced biologist, time of oocyte evaluation) or that spindle absence does not prevent fertilization in all cases. However, according to this meta-analysis, probably the lack of a meiotic spindle may have a subsequent effect during embryonic development.

To avoid damaging the spindle during the ICSI procedure, the embryologists rotated the oocyte by placing a hold pipette based on the first polar body position. However, the movement of the polar body inside the perivitelline space (because of possible physical displacement during oocyte denudation)

and/or migration of the spindle inside the oocyte can alter the relationship between these two structures, enabling the microinjection to impair the spindle (Silva *et al.*, 1999; Hardarson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001 a,b; Moon *et al.*, 2003; Rienzi *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2004; Konc *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2006; Rama Raju *et al.*, 2007). Generally, when there is meiotic spindle visualization, the isolated sperm is injected into the oocyte, taking special care not to damage this structure. Rienzi *et al.* (2003) reported a significantly lower normal fertilization rate and a higher rate of abnormal fertilization with a more frequent development of three pronuclei in oocytes with higher degree of deviation from the first polar body ($>90^\circ$). Fang *et al.*, (2007) reported that the fertilization rate of *in vivo* matured oocytes with spindles beneath or adjacent to the first polar body (angle of $0-5^\circ$) was significantly higher (93.3%) than all other groups of oocytes with greater deviation from the first polar body ($6-45^\circ$, $46-90^\circ$ and $>90^\circ$). However, Moon *et al.* (2003) and Rama Raju *et al.* (2007) did not show the same results. Taylor *et al.* (2006) concluded that the deviation angle of the spindle from the first polar body is not a reliable indicator of embryo quality or subsequent aneuploidy.

Most studies analyzing meiotic spindle have sought to draw attention to variables more directly related to laboratory activities. However, some authors suggest that the meta-analysis should be patient-oriented, i.e. primary outcomes should be clinical results (e.g. pregnancy rate); all other outcomes should be listed as secondary outcomes. Fertilization rate, cleavage rate, percentage of PN-

stage embryos with good morphology, percentage of day-3 top quality embryos and percentage blastocyst stage embryos are intermediate endpoints, which do not necessarily predict a better outcome and/or a more advantageous cost/effectiveness ratio. Despite the tendency in favour of oocytes with meiotic spindle, this meta-analysis failed to show any statistically significant difference in the most relevant and clinically significant endpoints in IVF: the clinical pregnancy rate and implantation rate. This observation can be related to a small cumulative sample size since only two studies supply data about pregnancy or implantation rates. Based on the pregnancy rate per transfer obtained in the group without a visible meiotic spindle (21/119, 17.6%), to detect a difference of 5% with a power of 80%, around 2000 transfers would be necessary for a definitive conclusion, i.e. above the total number included here. On the other hand, an increased number of best quality embryos may exert possible good effects on cumulative pregnancy rates following the transfer of frozen embryos. Moreover, one must be aware of the fact that a number of other significant predictors of the chance of pregnancy achievement exist in an individual patient, including cause of infertility, chromosomal status of the transferred embryo, as well as the quality and origin of spermatozoa (Griesinger and Diedrich, 2006). Thus, for a more consistent conclusion, this meta-analysis guides researchers to wait for the results of new controlled trials that have more information about clinical parameters.

In conclusion, the result of this meta-analysis indicates that the presence of a birefringent meiotic spindle in human oocytes can predict better fertilization

rate and embryo development. Nevertheless, it failed to show any statistically significant difference in clinically significant endpoints in IVF (pregnancy rate and implantation rate). This observation has clinical relevance mainly in countries where there is a legal limit on the number of oocytes that can be fertilized. Additional prospective studies with a large population will be helpful in understanding the importance of spindle presence and its characteristics in laboratory and clinical results.

Acknowledgment

The authors wish to thank the Grupo de Apoio a Pesquisa – UNESP for revising the English text.

REFERENCE

1. Balaban B, Urman B 2006 Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive BioMedicine Online* 12, 608–615.
 2. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR 1996 Fertilization and early embryology: Influence of maternal age on meiotic spindle assembly oocytes from naturally cycling women *Human Reproduction* 11, 2217–2222.
 3. Borini A, Lagalla C, Cattoli M, Cattoli M, Sereni E, Sciajno R, Flamigni C, Coticchio G. 2005 Predictive factors for embryo implantation potential. *Reproductive BioMedicine Online* 15, 653–668.
 4. Chamayou S, Alecci C, Ragolia C, Storaci G, Maglia E, Russo E, Guglielmino A 2006 Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos *Reproductive BioMedicine Online* 13, 661–666.
 5. Cohen Y, Malcov M, Schwartz T, Mey-Raz N, Carmon A, Cohen T, Lessing JB, Amit A, Azem F 2004 Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI. *Human Reproduction* 19, 649–654.
-

6. Cooke S, Tyler JPP, Driscoll GL 2003 Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development. *Human Reproduction* 18, 2397–2405.
 7. Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. 2004 What criteria for the definition of oocyte quality? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1034,132-144.
 8. Ebner T, Moser M, Tews G 2006 Is oocyte morphology prognostic of embryo potential after ICSI? *Reproductive BioMedicine Online* 12, 517–512.
 9. Eichenlaub-Ritter U, Shen Y, Tinneberg H-R 2002 Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus *Reproductive BioMedicine Online* 5, 117-124
 10. Eichenlaub-Ritter U, Peschke M 2002 Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Human Reproduction Update* 8,21–41
 11. Fang C, Mandy T, Li T, Peng WL, Zhou CQ, Zhuang GL, Leong M 2007 Visualization of meiotic spindle and subsequent embryonic development in *in vitro* and *in vivo* matured human oocytes *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 24, 547–551.
-

12. Griesinger G, Diedrich K 2006 The role of LH in ovarian stimulation: considerations. *Reproductive BioMedicine Online* 12, 404–406
 13. Hardarson T, Lundin K, Hamberger L. 2000 The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte. *Human Reproduction* 15, 1372–1376
 14. Higgins JP; Thompson SG; Deeks JJ; Altman DG. 2003 Measuring inconsistency in meta-analyses. *British Medical Journal* 327, 557–560.
 15. Hu Y, Betzendahl I, Cortvrindt R, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U. 2001 Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. *Human Reproduction* 16, 737–748.
 16. Konc J, Kanyo K, Cseh S 2004 Visualization and examination of the meiotic spindle in human oocytes with Polscope. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 21, 349–353.
 17. Madaschi C, Bonetti TCS, Braga DPAF, Pasqualotto FF, Iaconelli A, E Borges 2008 Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation *Fertility and Sterility* 90, 194-198.
 18. Montag M, Schimming T, van der Ven H 2006 Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. *Reproductive BioMedicine Online* 12, 442–446.
-

19. Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son W Y, Yoon S Hy, Lim JH. 2003 Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using Polscope enables the prediction of embryonic development competence after ICSI. *Human Reproduction* 18, 817–820.
 20. Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K 2007 Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using polscope imaging *Reproductive BioMedicine Online* 14, 166–174
 21. Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F, Iacobelli M, Minasi MG, Ferrero S, Tesarik J, Greco E 2003 Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte development potential after ICSI. *Human Reproduction* 18, 1289–1293.
 22. Roberts R, Franks S, Hardy K. 2002 Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Human Reproduction* 17, 2950–2956.
 23. Shen Y, Stalf T, Mehnert C, De Santis L, Cino I, Tinneberg H-R, Eichenlaub-Ritter U 2006 Light retardance by human oocyte spindle is positively related to pronuclear score after ICSI *Reproductive BioMedicine Online* 12, 737–751
 24. Silva CS, Kapura K, Odenberg R, Keefe DL 1999 The first polar body does not predict accurately the location of the metaphase II meiotic spindle in mammalian oocytes. *Fertility and Sterility* 71, 719–721.
-

25. Taylor TH, Gitlin S, Wrigth G, Mitchell-Leef D, Kort HI, Nagy ZP 2006 The meiotic spindle of human oocytes as viewed under the oosight and its relationship to chromosomal aneuploidy of subsequent embryo *Human Reproduction* 21(Suppl.1), i23
 26. Varghese AC, Goldberg E, Agarwal A 2007 Current and future perspectives on intracytoplasmic sperm injection: a critical commentary *Reproductive BioMedicine Online* 15, 719–727
 27. Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL 2001a Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by polscope before insemination. *Human Reproduction* 16, 1464–1468.
 28. Wang W, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL 2001b The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertility and Sterility* 75, 348–353
 29. Wang W H, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL 2002 Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates. *Fertility and Sterility* 77, 1274–1277.
 30. Wang, W.H., Keefe, D.L. 2002 Prediction of chromosome misalignment among *in vitro* matured human oocytes by spindle imaging with the PolScope. *Fertility and Sterility* 78, 1077–1081
-

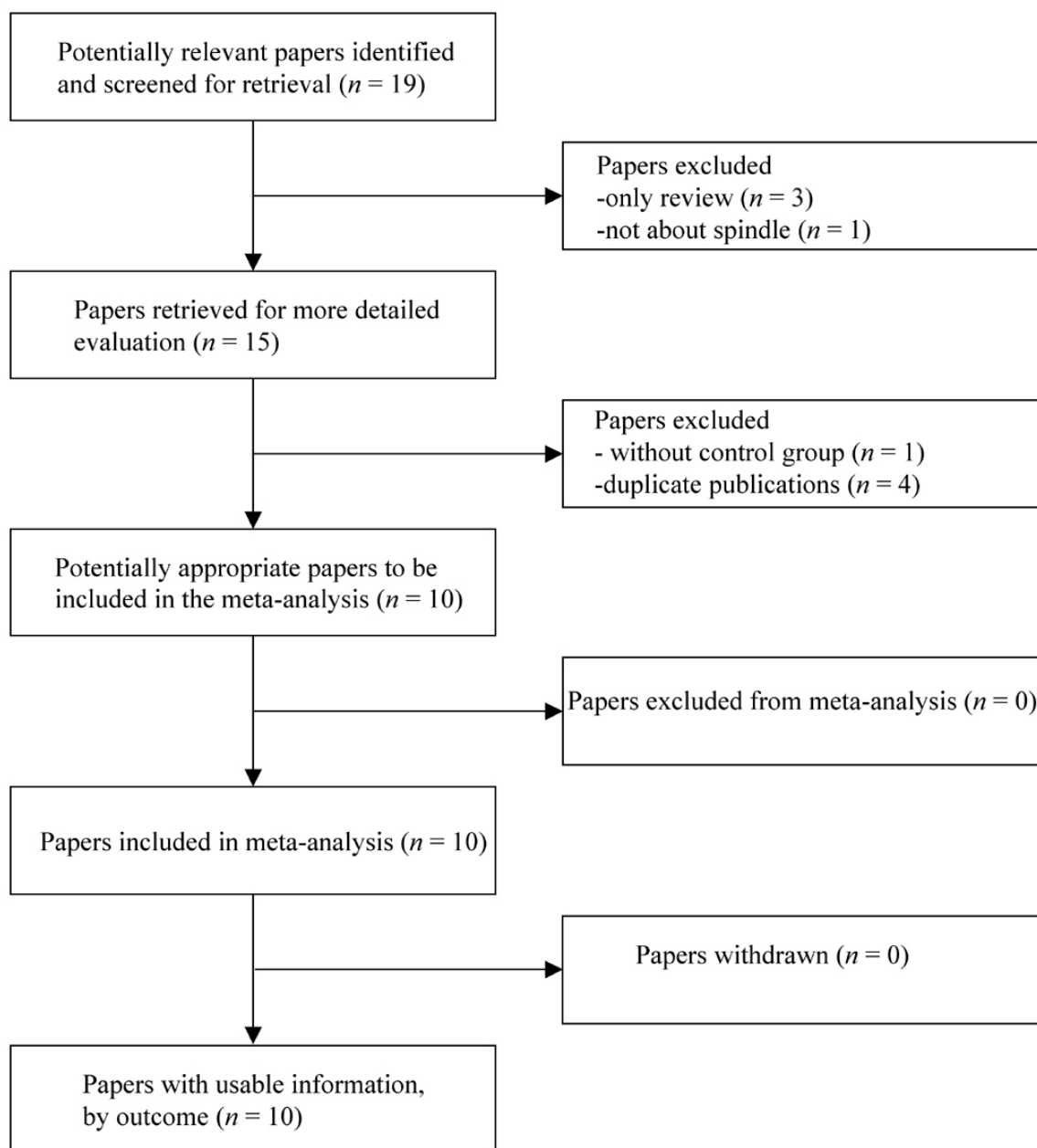
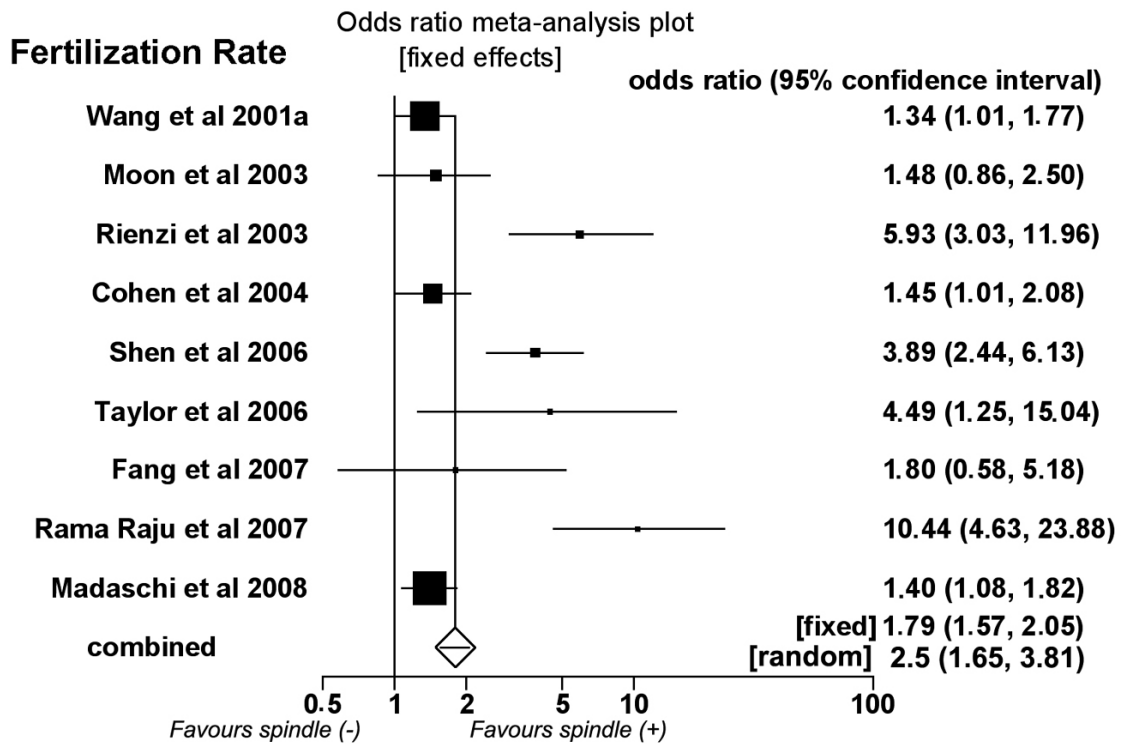


Figure 1. QUOROM statement flow diagram illustrating selection of trials included in the meta-analysis



Fixed effects: chi-squared (test odds ratio differs from 1) = 73.8 $P < 0.0001$

Random effects: chi-squared (test odds ratio differs from 1) = 18.8 $P < 0.0001$

Non-combinability of studies:- Breslow-Day = 63.6 (df = 8) $P < 0.0001$; - Cochran Q = 59.7 (df = 8) $P < 0.0001$;
- I^2 (inconsistency) = 86.6% (95% CI = 76% to 91.3%)

Figure 2. Forest plot for fertilization rate.

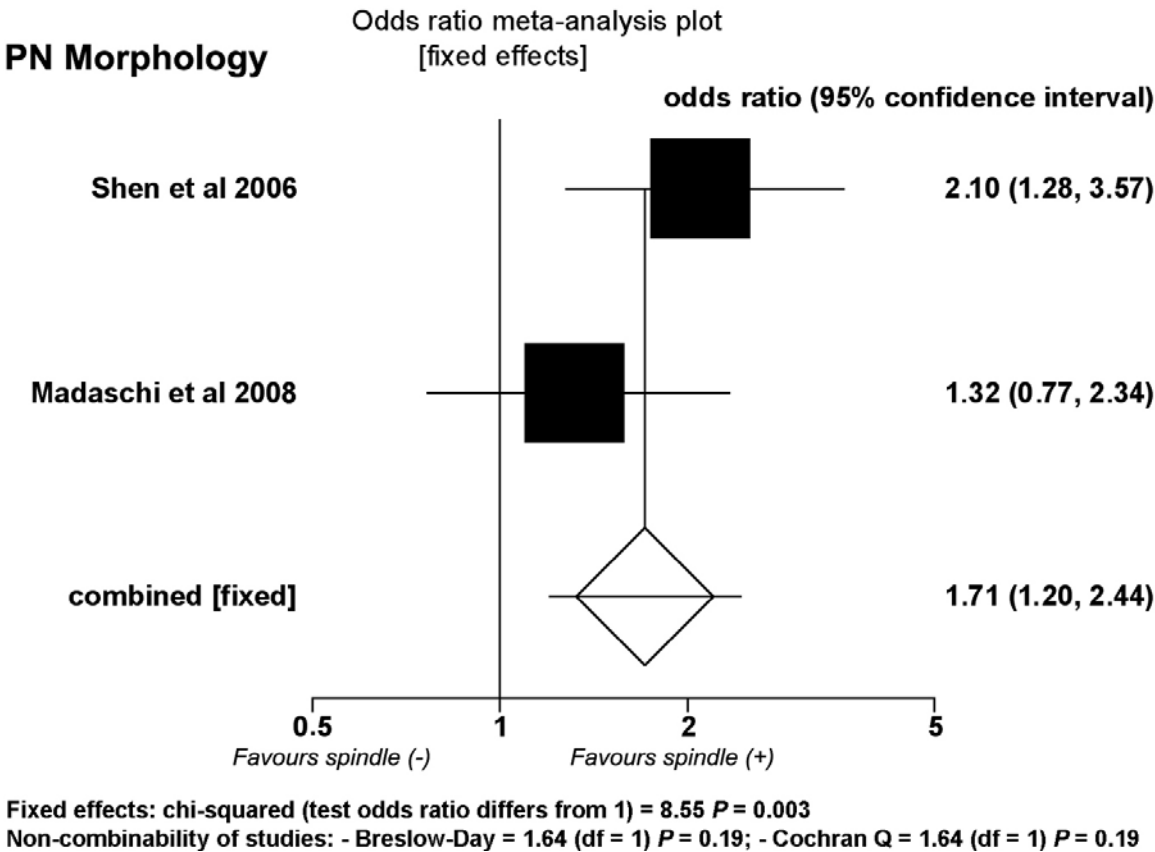


Figure 3. Forest plot for PN stage morphology. PN. Pro-nucleus.

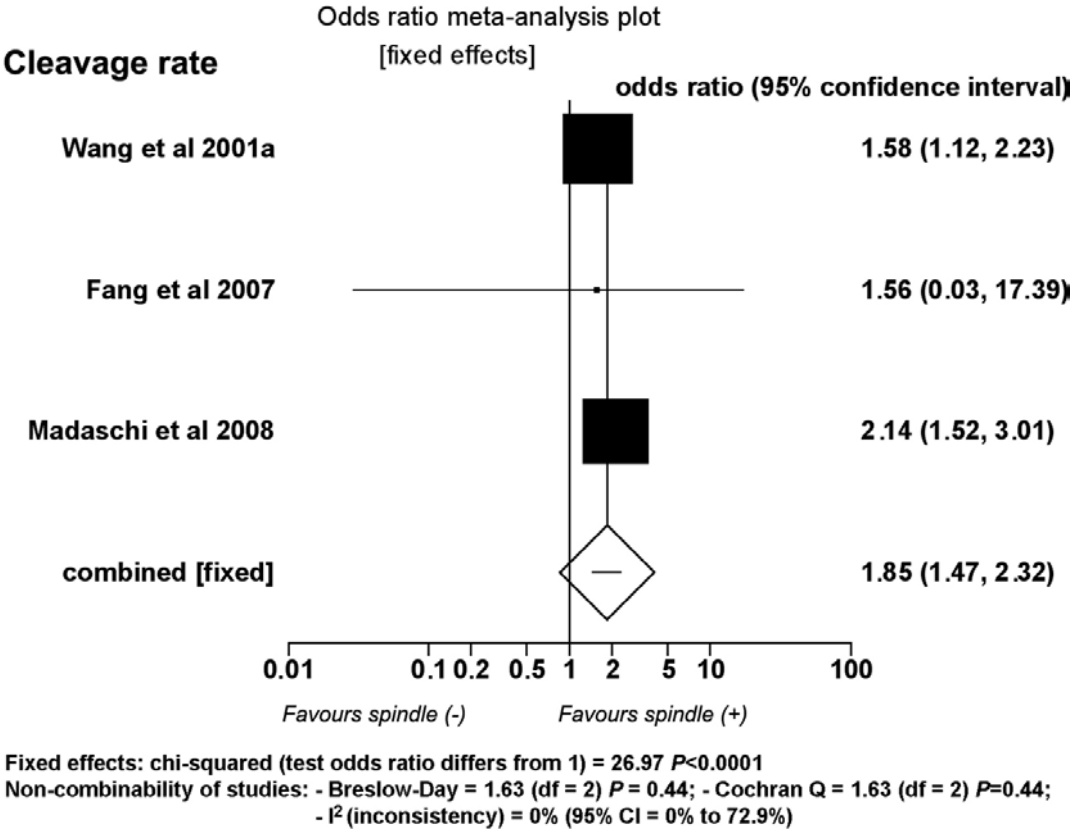


Figure 4. Forest plot for cleavage rate.

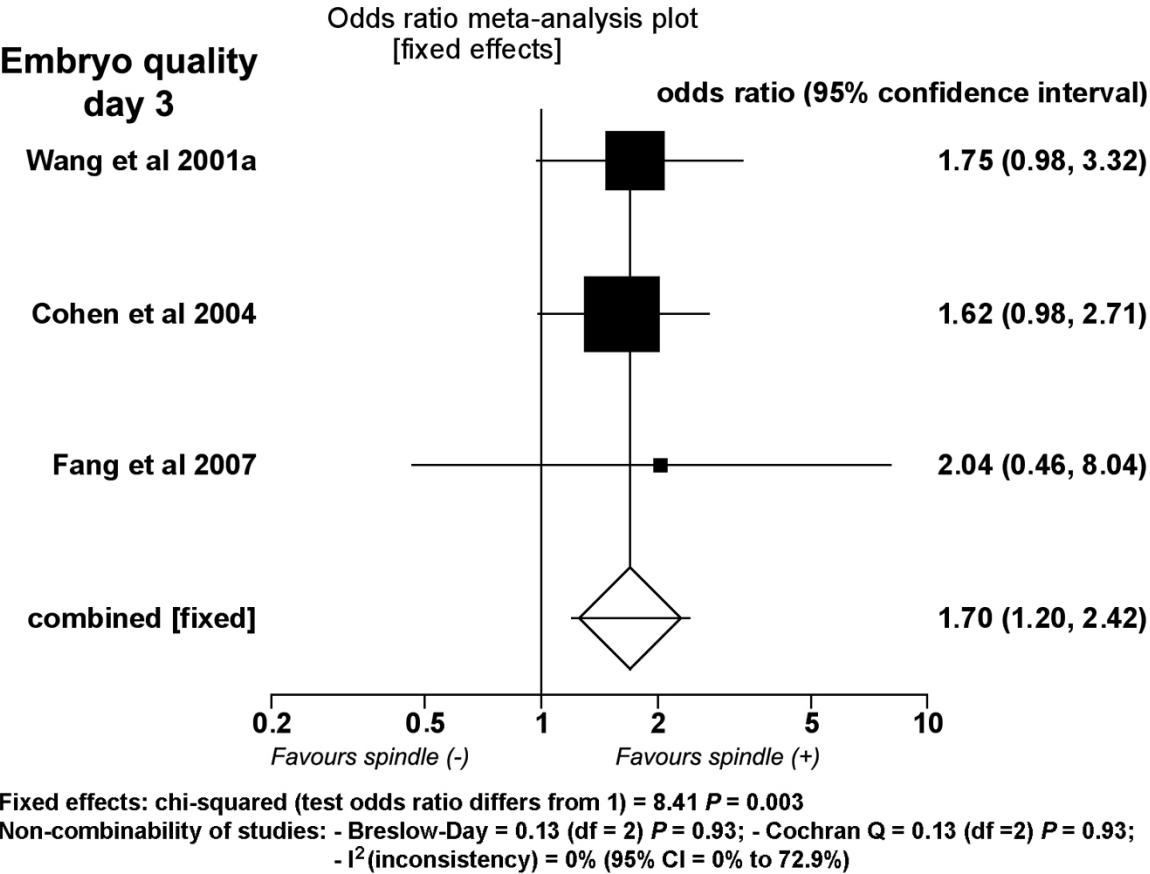


Figure 5. Forest plot for day 3 embryo stage quality.

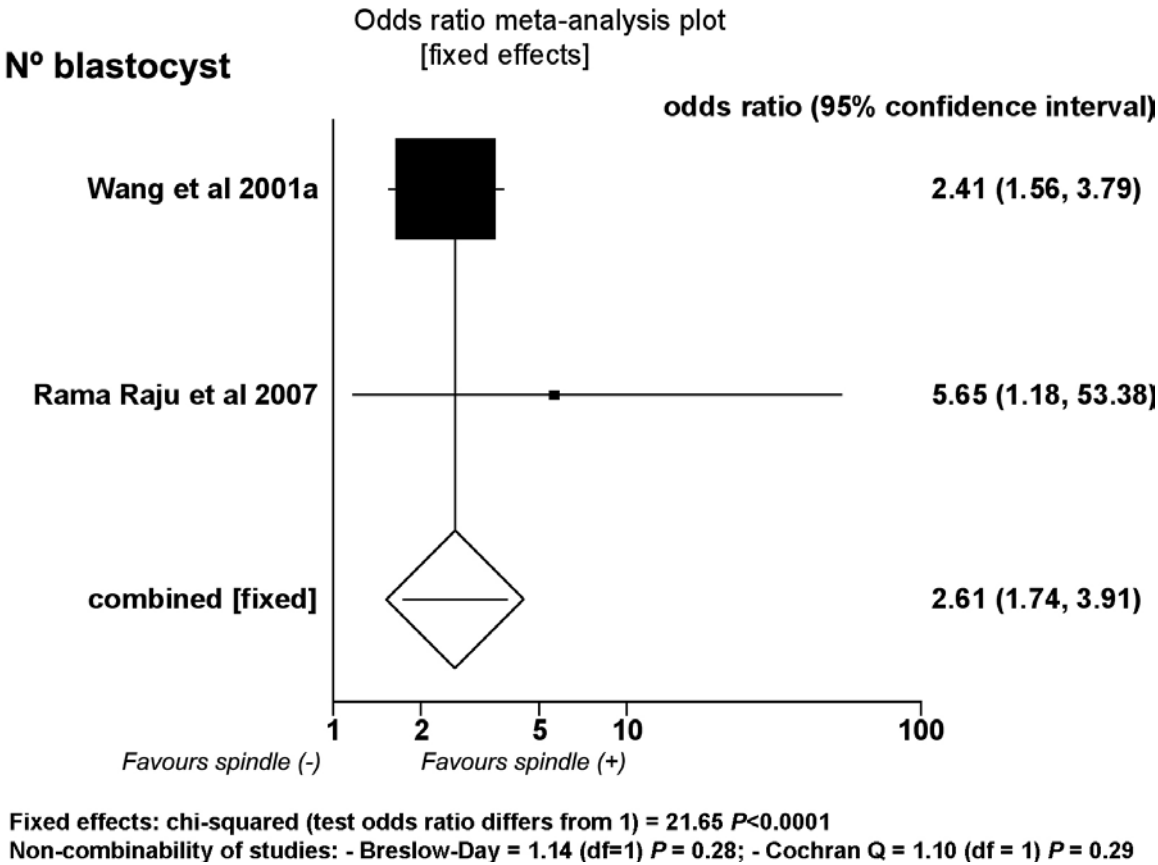


Figure 6. Forest plot for number of embryos at blastocyst stage.

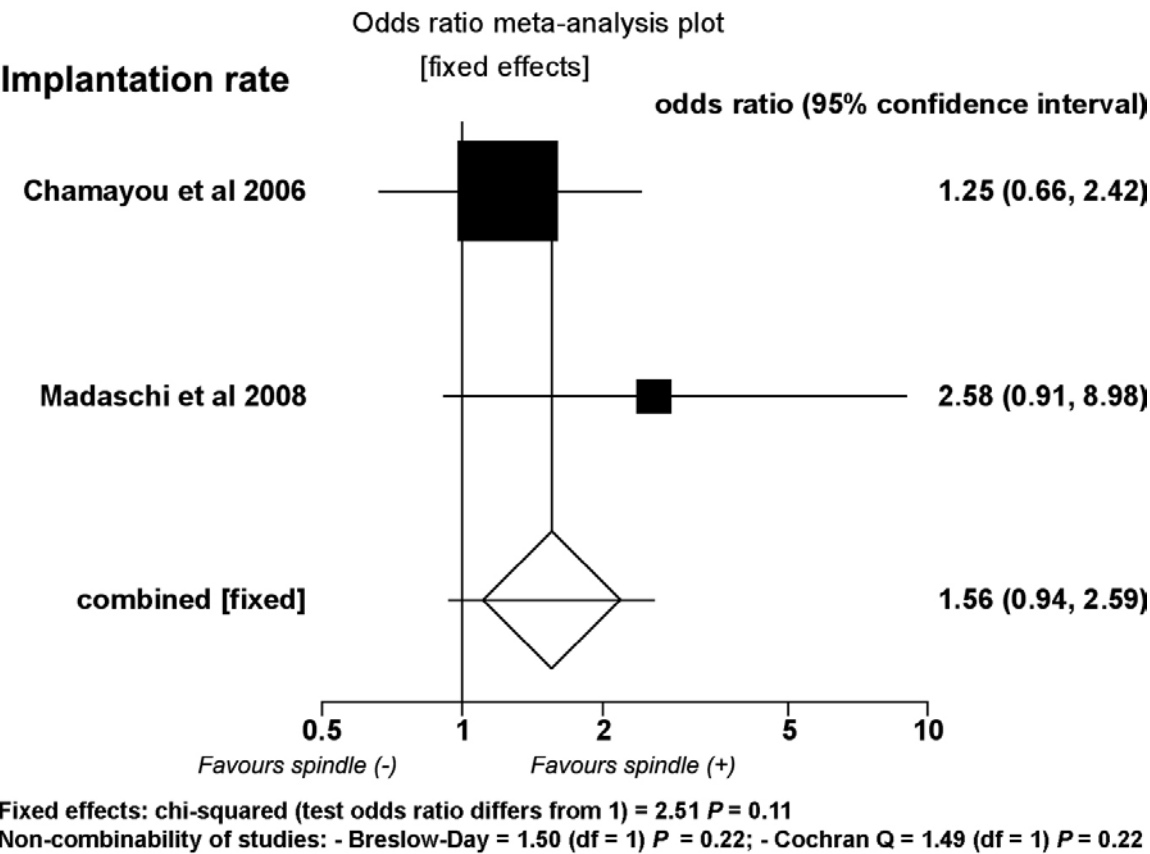
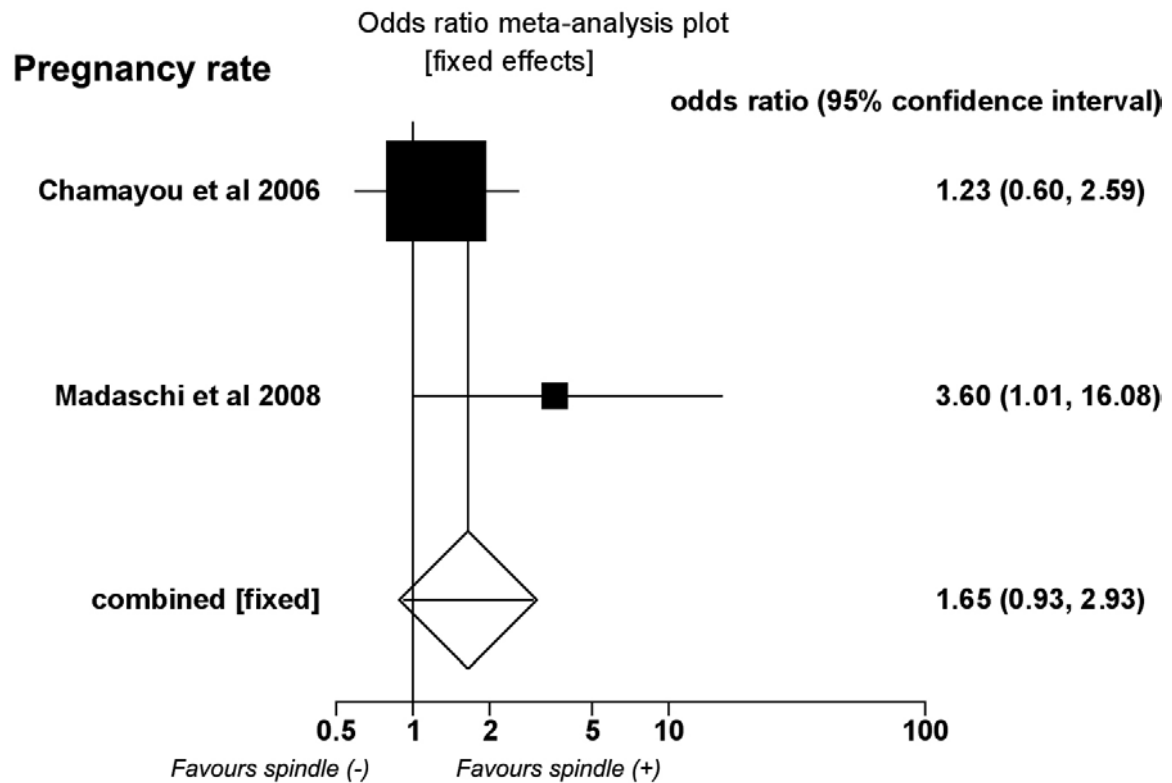


Figure 7. Forest plot for implantation rate.



Fixed effects: chi-squared (test odds ratio differs from 1) = 2.47 $P = 0.11$

Non-combinability of studies: - Breslow-Day = 2.42 (df=1) $P = 0.12$; - Cochran Q = 2.36 (df =1) $P = 0.12$

Figure 8. Forest plot for clinical pregnancy rate per embryo transfer.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: “Correlação da maturação e da morfologia do óvulo humano com as características do fuso meiótico e da zona pelúcida”

Nome da Voluntária: _____

Você em breve será submetida à Fertilização “in vitro” (bebê de proveta) com transferência de embriões para tratamento de infertilidade. Por isso está sendo convidada a participar, de um estudo clínico que envolve avaliação dos seus óvulos coletados no procedimento de fertilização “in vitro”.

A procura de métodos para verificar se um óvulo realmente tem boas condições antes da fertilização “in vitro” tem sido muito investigada no tratamento da infertilidade. Duas estratégias são usada na classificação dos óvulos: 1- a avaliação geral das características dos óvulos utilizando uma microscópio convencional (amadurecimento, forma, cor, etc); e 2- a avaliação de estruturas específicas utilizando microscópio especial (luz polarizada). Contudo, ainda não há uma conclusão definitiva sobre essas avaliações.

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

Avaliar a correlação do amadurecimento dos óvulos e suas características avaliadas pelo microscópio convencional e características de áreas específicas dos óvulos (fuso meiótico e zona pelúcida) avaliadas pelo microscópio especial

Os resultados da pesquisa podem indicar mais um método de avaliação da qualidade dos óvulos, representando benefício para quem necessita de tratamento de infertilidade com fertilização “in vitro”.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Os óvulos coletados como parte de seu tratamento (fertilização “in vitro”) são rotineiramente avaliados em relação ao estágio de amadurecimento. Eles são divididos em 3 categorias: os maduros, chamados de “metáfase II” e os imaturos que podem ser os chamados “Metáfase I” (sem amadurecimento completo) e os chamados de “vesícula germinativa” (muito imaturos).

Se você concordar em participar deste estudo, os óvulos maduros serão apenas analisados nos dois microscópios e logo enviados para a realização dos procedimentos de fertilização “in vitro”. Os imaturos, que não podem ser encaminhados para o tratamento, serão analisados nos dois microscópios e depois deixados em condições artificiais esperando que eles amadureçam. Se amadurecerem serão novamente avaliados pelos dois microscópios. Os óvulos amadurecidos em vitro para esse estudo não serão utilizados no seu tratamento

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Não há métodos alternativos a esses procedimentos. Conduto você pode simplesmente não querer que seus óvulos sejam avaliados. É possível que seus óvulos imaturos sejam amadurecidos no laboratório e depois destinados para o tratamento. Contudo os resultados (chance de conseguir um bom embrião e de engravidar) com esses óvulos não são bons. De qualquer forma, apenas se colher 6 ou mais óvulos maduros é que você participará desse estudo

RISCOS

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. A coleta dos óvulos faz parte dos procedimentos rotineiros do seu tratamento, não sendo prevista coleta adicional. Para a coleta de óvulos, que é parte de seu tratamento regular, é necessária sedação feita pela veia e

posteriormente os ovários ficam aumentados de tamanho o que pode levar a algum desconforto na sua barriga. O aumento dos ovários é resultado mais da estimulação dos ovários pelos hormônios utilizados, necessários para seu tratamento, e não parte do estudo.

Por outro lado, as avaliações dos óvulos maduros não os prejudicam.

BENEFÍCIOS

Os resultados da pesquisa podem indicar mais um método de avaliação da qualidade dos óvulos, representando benefício para quem necessita de tratamento de infertilidade com fertilização “in vitro”.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pela equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Lembramos que não é esperado nenhum dano para a sua saúde decorrente diretamente desse estudo

Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS (Ressarcimento e indenização)

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a análise dos óvulos relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, entre em contato com a bióloga Claudia Petersen no telefone (16) 3911-1100 ou no endereço Av João Fiusa 689 Ribeirão Preto – São Paulo ou com qualquer médico do Centro de Reprodução Humana Professor Franco jr.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que meus óvulos serão submetidos à análise adicional à necessária a meu tratamento e não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento com todas as páginas adicionais rubricadas.

_____/_____/_____
(Assinatura do Paciente) dia mês ano

(Nome do Paciente – letra de forma)

_____/_____/_____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima

_____/_____/_____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

29 08 08 11:03

p. 1



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 592/2008

Registro CONEP: 14797 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro no CEP: 003/08

Processo nº 25000.063535/2008-88

Projeto de Pesquisa: *"Correlação da maturação e da morfologia do óócito humano com as características do fuso meiótico e da zona pelúcida"*

Pesquisador Responsável: Dra. Cláudia Guilhermino Petersen Rodrigues da Costa

Instituição: Centro de Reprodução Humana Pro^f. Franco Junior (Único centro)

CEP de origem: Universidade de Ribeirão Preto/UNAERP/SP

Área Temática Especial: Reprodução humana

Patrocinador: Não se aplica

Comentários/Recomendações do Parecer 363/2008.

1. Não consta o cronograma de execução da pesquisa, apenas informa que a duração total será de 6 meses, a partir da aprovação. Entretanto, pede-se apresentar o cronograma com detalhamento do período de execução e das respectivas atividades.
2. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – deverá ser reescrito para adequação às previsões da Resolução do CNS 196/96 (arts. IV e IV.2 e IV.3) – no que se referem ao uso de linguagem clara e acessível, na forma de convite, incluir a justificativa, os objetivos e os procedimentos que serão utilizados, os desconfortos e riscos possíveis e os benefícios esperados, a liberdade do sujeito se recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma e sem prejuízo de seus cuidados, a garantia do sigilo que assegure a privacidade dos participantes e dos dados envolvidos na pesquisa, as formas de ressarcimento das despesas decorrentes da participação na pesquisa. Além disso, deve-se incluir o endereço e telefone do pesquisador principal para contato em caso de necessidade de esclarecimentos antes e durante o curso da pesquisa e incorporar ao TCLE a página de assinaturas. Se por questões de configuração tal página continuar constituindo-se uma folha em separado, solicita-se o cuidado de obter a rubrica do sujeito de pesquisa nas demais folhas do TCLE, considerando-se a proteção do sujeito bem como do pesquisador.

Respostas às recomendações do Parecer 363/2008.

- 1- Resposta ao item 01: apresentou cronograma com detalhamento do período de execução e das respectivas atividades a serem desenvolvidas;
- 2- Resposta ao item 02: Apresentou TCLE reformulado atendendo aos quesitos enumerados acima.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: **Protocolo aprovado.**

Brasília, 27 de agosto de 2008.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS