

MARIA CRISTINA PICINATO
MEDEIROS DE ARAÚJO¹

CARLOS HENRIQUE MEDEIROS DE ARAÚJO²

MARCELO GONDIM ROCHA³

WELLINGTON DE PAULA MARTINS⁴

ROSANA MARIA DOS REIS⁵

RUI ALBERTO FERRIANI⁶

PAULA ANDREA DE ALBUQUERQUE
SALLES NAVARRO⁵

Morfologia do primeiro corpúsculo polar e taxas de fertilização, clivagem e qualidade embrionária

First polar body morphology and fertilization rate, cleavage rate, and embryo quality

Artigos originais

Palavras-chave

Oócitos/fisiologia
Oócitos/ultraestrutura
Injeções de esperma intracitoplasmicas
Fertilização
Implantação do embrião
Fertilização in vitro
Controle de qualidade

Keywords

Oocytes/ physiology
Oocytes/ultrastructure
Sperm injections, intracytoplasmic
Fertilization
Embryo implantation
Fertilization in vitro
Quality control

Resumo

OBJETIVO: determinar a relação entre a morfologia do primeiro corpúsculo polar (CP) de oócitos humanos e as taxas de fertilização e clivagem e a qualidade embrionária em procedimentos de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI). **MÉTODOS:** estudo retrospectivo de 582 ciclos consecutivos de ICSI no período de julho de 2003 a julho de 2005. A morfologia do primeiro CP foi avaliada com revisão de 3.177 oócitos em metáfase II, imediatamente antes da realização da ICSI, sempre pelo mesmo observador. O CP foi classificado nas seguintes categorias: CP intacto e de tamanho normal, CP fragmentado ou CP de tamanho aumentado. Avaliamos as taxas de fertilização e de clivagem, o número e a proporção de embriões de boa qualidade em cada um dos três grupos avaliados 48 horas após a ICSI (D2). Foram considerados de boa qualidade os embriões com quatro células, sem fragmentação e com blastômeros simétricos em D2. **RESULTADOS:** as taxas de fertilização, clivagem e de formação de embriões de boa qualidade resultantes da inseminação de oócitos com o CP aumentado (20,7, 18,7 e 5%, respectivamente) foram significativamente menores que as de oócitos com o CP intacto e de tamanho normal (70,8, 62,5 e 19%, respectivamente) ou CP fragmentado (69,7, 60,5 e 17,1%, respectivamente). **CONCLUSÕES:** observamos que a presença do primeiro CP aumentado relaciona-se com piores taxas de fertilização, clivagem e de formação de embriões de má qualidade. Entretanto, a fragmentação no primeiro CP parece não interferir nos resultados da ICSI.

Abstract

PURPOSE: to determine the relationship between the morphology of the first spindle pole of human oocytes and rates of fertilization, fragmentation and embryo quality in procedures of Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). **METHODS:** retrospective study of 582 consecutive ICSI cycles, from July 2003 to July 2005. The morphology of the first spindle pole (SP) was assessed through the analysis of 3,177 oocytes in metaphase II, immediately before the ICSI procedure, always by the same observer. SP has been classified in the following categories: normal size intact, fragmented or augmented SP. Fertilization rate and fragmentation, and the number and rate of good quality embryos in each one of the three groups studied have been evaluated, 48 hours after ICSI (D2). Embryos with four cells, without fragmentation and with symmetric blastomeres in D2 were considered as of good quality. **RESULTS:** rates of fertilization, fragmentation and of good quality embryo formation, resulting from oocyte insemination, with augmented SP (20.7, 16.7 and 5% respectively) were significantly lower than the ones from intact and normal size SP (70.8, 62.5 and 19%, respectively) or from fragmented SP oocytes (69.7, 60.5 and 17.1%, respectively). **CONCLUSIONS:** it has been observed that the presence of augmented first spindle pole is related to worse rates of fertilization, fragmentation and bad quality embryo formation. Nevertheless, fragmentation in the first spindle pole of the oocyte does not seem to affect ICSI results.

Correspondência:

Maria Cristina Picinato Medeiros de Araújo
Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas
da FMRP-USP
Avenida Bandeirantes, 3.900 – Monte Alegre
CEP 14049-900 – Ribeirão Preto/SP
Fone: (16) 3602-2221 / Fax: (16) 3602-2810
E-mail: picinato@fmrp.usp.br ou romareis@fmrp.usp.br

Recebido

9/1/08

Aceito com modificações

1/7/08

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto (SP), Brasil.

¹ Embriologista do Laboratório de Reprodução Assistida, Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP - Ribeirão Preto (SP), Brasil.

² Professor do Departamento de Enfermagem em Educação e Saúde Comunitária da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM - Uberaba (MG), Brasil.

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

⁴ Médico Assistente do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP - Ribeirão Preto (SP), Brasil.

⁵ Professora Associada do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP - Ribeirão Preto (SP), Brasil.

⁶ Professor Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP - Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Introdução

A introdução da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) como técnica de reprodução assistida trouxe muitas informações sobre a morfologia do oócito, pois para a realização desta técnica é necessário o desnudamento oocitário, deixando-o livre das células do *cumulus oophorus*, o que permite a sua melhor observação antes e durante o processo de fertilização, permitindo correlacionarem-se parâmetros da morfologia oocitária com a qualidade e viabilidade embrionária^{1,2}. A remoção das células do *cumulus oophorus* antes da ICSI, permite a avaliação de muitos parâmetros morfológicos oocitários, como a forma do oócito, a coloração e a granulação do citoplasma, a regularidade e a espessura da zona pelúcida, o tamanho do espaço perivitelínico, a presença de vacúolos, a presença ou ausência da vesícula germinativa e do primeiro corpúsculo polar (1º CP), assim como de sua morfologia³. É importante ressaltarmos que a identificação e a utilização de critérios objetivos capazes de prever a qualidade oocitária permitiriam tanto melhorar os resultados dos procedimentos de reprodução assistida, auxiliando na seleção oocitária e embrionária, como minimizar os problemas éticos relacionados ao congelamento embrionário, uma vez que menos oócitos poderiam ser inseminados, e, conseqüentemente, menos embriões com qualidade inadequada seriam produzidos^{4,5}. Contudo, a influência das características morfológicas oocitárias nas taxas de fertilização, gravidez e implantação, assim como na qualidade embrionária, ainda são bastante controversas^{6,7}.

A utilização de critérios morfológicos obtidos por meio da microscopia óptica é um subsídio importante para o embriologista em serviços de reprodução humana, tanto no momento da escolha do oócito para a ICSI, como da seleção do embrião a ser transferido para o útero materno, com o objetivo de melhorar a taxa de gravidez⁸. A ICSI é realizada quando os oócitos são classificados como maduros, ou seja, atingiram a metáfase II, que é caracterizada ao microscópio pela observação do 1º CP⁹. A ausência do 1º CP, por sua vez, pode indicar que o oócito ainda é imaturo ou que já se tornou pós-maturo, ambos inadequados para serem inseminados. O CP não participa da fertilização, mas a sua formação é um passo fundamental no processo de maturação oocitária, sendo sua visualização um indicativo importante de maturidade oocitária, fundamental para a realização dos procedimentos de ICSI ou para avaliação do sucesso dos protocolos de maturação *in vitro* oocitária^{10,11}. Inicialmente acreditava-se que a morfologia do 1º CP indicava idade pós-ovulatória do oócito⁸. Todavia, alguns estudos mostraram que a transferência de embriões selecionados com base na morfologia do 1º CP resultou em uma taxa de fertilização mais

alta e embriões de melhor qualidade, com maiores taxas de implantação e de gravidez^{6,12,13}. Contudo, estes dados são controversos, uma vez que encontramos estudos com resultados contrários na literatura¹⁴⁻¹⁶.

Em virtude da grande aplicabilidade clínica de potenciais critérios morfológicos passíveis de predizerem a qualidade oocitária, um dos determinantes mais importantes da qualidade embrionária¹⁷, assim como das controvérsias encontradas na literatura sobre a influência da morfologia do primeiro CP⁹ nas taxas de sucesso dos procedimentos de reprodução assistida, realizamos o presente estudo. O objetivo é avaliar a influência da morfologia do primeiro corpúsculo polar nas taxas de fertilização, clivagem e qualidade embrionária.

Métodos

Nesse estudo, realizou-se análise longitudinal retrospectiva de 3177 oócitos em metáfase II, obtidos de 582 ciclos consecutivos de ICSI, realizados de julho de 2003 a julho de 2005, no Laboratório de Reprodução Assistida do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Inicialmente, o período menstrual foi programado com o uso de anticoncepcionais orais combinados, iniciados no ciclo prévio e interrompidos cinco dias antes da data prevista de início da estimulação ovariana. Para supressão hipofisária, foi utilizado um agonista da gonadotrofina (GnRH), acetato de leuprolida (Lupron®, Abbott; Reliser®, Serono, Brasil) 10 UI/dia por via subcutânea ou nafarelina (Synarel®, Pharmacia, Brasil), via nasal 400 µg/dia, iniciado dez dias antes da menstruação programada e usado até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG). Do primeiro ao terceiro dia do ciclo menstrual, foi realizada ultra-sonografia transvaginal (USTV) para confirmar a supressão ovariana e, após ser iniciada a estimulação ovariana controlada com FSH recombinante (Puregon®, Organon, Brasil ou Gonal-F®, Serono, Brasil) na dose de 200 a 450 UI/dia nos primeiros cinco dias, ajustada de acordo com a resposta ovariana, a partir do sexto dia da estimulação. Foi administrado hCG urinário (Profasi®, Serono, Brasil), 10.000 UI intramuscular ou recombinante (Ovidrel®, Serono, Brasil), 250 µg via subcutânea, quando houve dois ou mais folículos ≥18 mm de diâmetro médio. A captação oocitária foi realizada por punção do fundo de saco vaginal guiada por USTV 34 a 36 horas após a administração do hCG. O conteúdo folicular foi aspirado sob pressão de 100 mmHg em tubos de Falcon e mantido a 37°C. Os complexos cumulus-oócitos (CCO) foram separados do fluido folicular sob estereomicroscópio (Nikon, Modelo SMZ-645) e lavados em meio de cultura HTF modificado

com HEPES (Irvine Scientific) suplementado com 10% de soro sintético substituto (SSS-Irvine Scientific), Santa Ana, CA, EUA, antes de serem transferidos para placas de cultivo, previamente incubadas a 37°C e 5% de CO₂ em ar, contendo meio de cultura HTF (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EUA) suplementado com 10% de SSS. Após um período de duas a cinco horas de incubação no referido meio de cultivo, procedeu-se à remoção das células do *cumulus*, por meio da exposição dos CCO a hialuronidase (H-4272, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), na concentração de 80 UI/mL, em HTF-HEPES, suplementado com 10% de SSS por 30 segundos, seguida pela remoção mecânica usando micropipetas de vidro.

As amostras de sêmen foram obtidas logo após a captação oocitária, sendo manipuladas e analisadas para realização de ICSI, seguindo as recomendações para infertilidade masculina⁷.

Antes da ICSI os oócitos desnudados foram colocados em microgotas de cinco µL de HTF-HEPES, suplementado com 10% de SSS, em placas de Falcon e observados sob microscópio invertido (aumento de 400 vezes), com contraste óptico de Hoffman. Foi avaliada a morfologia do 1º CP imediatamente antes da ICSI, caracterizando-se em três grupos (Figura 1): CP intacto e de tamanho normal, com aspecto ovóide e superfície lisa; CP fragmentado, com aspecto irregular e superfície rugosa; CP de tamanho aumentado, que apresenta-se nitidamente maior que os anteriores e sem fragmentação. Esta caracterização foi realizada por meio de avaliações de uma única observadora (MCPMA), de acordo com os critérios descritos por Ebner et al.¹¹.

A ICSI foi realizada conforme previamente descrito¹⁸, 36 a 41 horas após a administração do hCG. Após a ICSI, os oócitos foram incubados isoladamente em microgotas de 25 µL de HTF + 10% SSS, a 37°C e 5% de CO₂ em ar. A avaliação da fertilização foi verificada de 18 a 20 horas após a realização da ICSI, caracterizando-se como fertilização normal, a visualização da presença de dois

pronúcleos e de dois CPs. Os oócitos que apresentavam um, três ou mais pronúcleos foram classificados como anormais, sendo então considerados inviáveis, e posteriormente descartados. A clivagem foi verificada em torno de 24 horas após a fertilização observando a divisão celular. A qualidade embrionária foi avaliada seguindo as variáveis de porcentagem de fragmentação citoplasmática, simetria e número de blastômeros. Foram considerados embriões de boa qualidade no segundo dia (D2) após a ICSI, aqueles com quatro células, blastômeros simétricos e sem fragmentação.

Para análise estatística, aplicando o teste exato de Fisher, comparamos as taxas de fertilização, de clivagem e de formação de embriões de boa qualidade oriundas da inseminação de oócitos com CP intacto e de tamanho normal, CP fragmentado e CP aumentado, utilizando o programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Considerou-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Foram analisados 3.177 oócitos em metáfase II, obtidos de 582 ciclos consecutivos de ICSI, divididos em três categorias, de acordo com a morfologia do 1º CP: CP íntegro e de tamanho normal (1.366 oócitos), CP fragmentado (1.448 oócitos) e CP aumentado (363 oócitos) (Tabela 1).

Dos 1.366 oócitos maduros inseminados com CP normal, 967 oócitos fertilizaram normalmente (70,8%), 854 clivaram (62,5%) e 260 evoluíram para embriões de boa qualidade (19%). Dos 1.448 oócitos maduros inseminados com CP fragmentado, 1.008 oócitos fertilizaram normalmente (69,7%), 876 clivaram (60,5%) e 248 evoluíram para embriões de boa qualidade (17,1%).

Dos 363 oócitos maduros inseminados com CP aumentado, 75 oócitos fertilizaram normalmente (20,7%), 68 clivaram (18,7%) e 18 evoluíram para embriões de boa qualidade (5%), conforme Tabela 1.

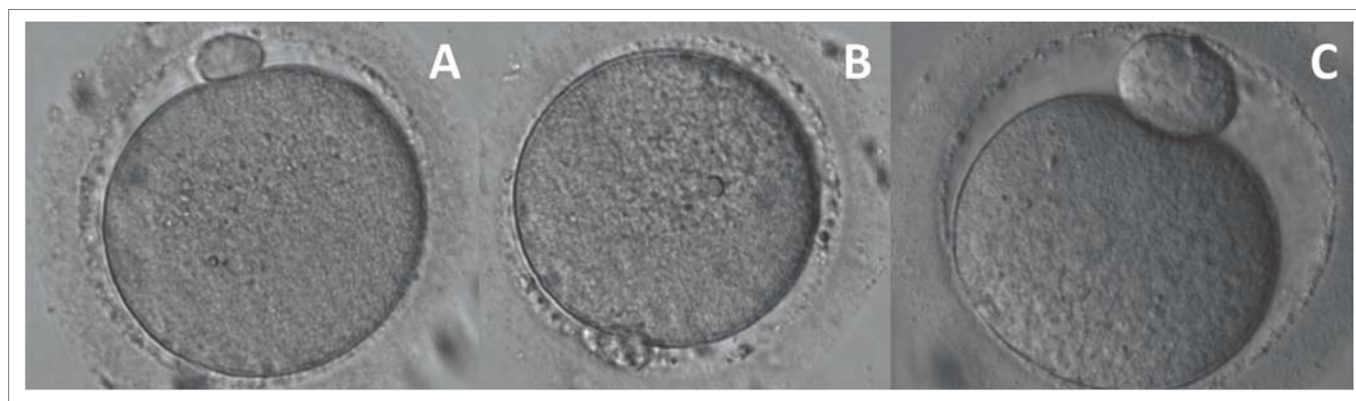


Figura 1 - Morfologia do primeiro corpúsculo polar (CP). (A) corpúsculo polar intacto de tamanho normal. (B) corpúsculo polar fragmentado. (C) corpúsculo polar aumentado. Imagem obtida por meio de microscopia óptica invertida com aumento de 400 vezes. Barra de escala=20 µm.

As taxas de fertilização, clivagem e de formação de embriões de boa qualidade resultantes da inseminação de oócitos com o CP aumentado foram significativamente menores que as de oócitos com o CP intacto e de tamanho normal ou CP fragmentado (Tabela 1).

Discussão

Para aperfeiçoarmos os resultados obtidos por meio da utilização de procedimentos de reprodução assistida, seriam fundamentais a identificação e a utilização de parâmetros não invasivos e inócuos, capazes de predizerem a qualidade oocitária, um dos principais determinantes da qualidade embrionária e, subseqüentemente, do sucesso do procedimento realizado. A remoção das células do *cumulus* antes da ICSI permite a melhor observação oocitária antes e durante o processo de fertilização, possibilitando correlacionarem-se parâmetros da morfologia oocitária, entre os quais podemos citar a presença e a morfologia do 1º CP, com a qualidade e viabilidade embrionária. Alguns estudos mostraram que a transferência de embriões selecionados com base na morfologia do 1º CP resultou em uma taxa de fertilização mais alta e embriões de melhor qualidade, com maiores taxas de implantação e de gravidez^{6,10,11}. Contudo, estes dados são controversos, uma vez que encontramos estudos com resultados contrários na literatura¹⁴, persistindo a indefinição da potencial influência da morfologia do 1º CP nas taxas de sucesso dos procedimentos de ICSI, o que motivou a realização do presente estudo.

Os oócitos captados após a estimulação ovariana com GnRHs podem apresentar diferentes graus de maturação nuclear e de morfologia do 1º CP, pois eles passaram por tempos diferentes de maturação citoplasmática e nuclear. A ICSI é realizada quando os oócitos são classificados como maduros, ou seja, atingiram a metáfase II, que é caracterizada ao microscópio pela observação do 1º CP⁸. A ausência do 1º CP, por sua vez, pode indicar que o oócito ainda é imaturo ou que já se tornou pós-maturo, ambos inadequados para serem inseminados. O CP não participa da fertilização, mas a sua formação é um passo fundamental no processo de maturação oocitária, sendo sua visualização um indicativo importante de maturidade oocitária, fundamental para a realização dos procedimentos de ICSI ou para avaliação de sucesso dos protocolos de maturação oocitária *in vitro*^{12,13}.

A maturação oocitária da prófase I para a metáfase II inicia-se com a quebra da vesícula germinativa, associada à redução do fluxo de inibidores da meiose, liberados pelas células da granulosa para o oócito¹⁹. Neste momento, o oócito deverá ter atingido um nível ideal de maturação nuclear e citoplasmática, necessário para garantir condições adequadas de fertilização e desenvolvimento embrionário

Tabela 1 - Distribuição das taxas de fertilização, clivagem e embriões de boa qualidade de acordo com a morfologia do primeiro corpúsculo polar

Parâmetros	Morfologia do primeiro corpúsculo polar		
	Normal	Fragmentado	Aumentado
Oócitos maduros inseminados	1.366	1.448	363
Número de oócitos fertilizados	967	1.008	75
Taxa de fertilização (%)	70,8 ^a	69,7 ^a	20,7 ^b
Clivados	854	876	68
Taxa de clivagem (%)	62,5 ^c	60,5 ^c	18,7 ^d
Embriões de boa qualidade	260	248	18
Proporção de embriões de boa qualidade (%)	19 ^e	17,1 ^e	5 ^f

a,c,e=sobrescritos iguais na mesma linha indicam ausência de diferença significativa ($p>0,05$); a,b,c,d,e,f=diferentes sobrescritos na mesma linha indicam presença de diferença significativa ($p<0,05$); valores de p obtidos pelo teste exato de Fisher; taxa de fertilização=número de oócitos fertilizados dividido pelo número de oócitos inseminados; taxa de clivagem=número de oócitos fertilizados clivados dividido pelo número de oócitos fertilizados; proporção de embriões de boa qualidade: número de embriões com 4 células, simétricas e sem fragmentação no segundo dia pós-inseminação dividido pelo número total de embriões produzidos.

subseqüente. Na literatura é enfatizado que a sincronia entre a maturidade nuclear e citoplasmática oocitária é um aspecto fundamental para que o embrião resultante apresente bom desenvolvimento e viabilidade²⁰. Encontram-se relatos controversos de que a presença do 1º CP intacto e do espaço perivitelínico normal seja sugestiva de melhor sincronia entre a maturação citoplasmática e nuclear oocitária, e, conseqüentemente, da melhor qualidade oocitária²⁰. Estes dados foram reforçados por achados encorajadores^{10,11} que sugeriram um papel prognóstico importante da morfologia do primeiro CP na qualidade embrionária.

Evidenciamos menores taxas de fertilização, de clivagem e de formação de embriões de boa qualidade, resultantes da inseminação de oócitos com o CP aumentado, quando comparados a oócitos com o CP intacto e de tamanho normal ou fragmentado. Nossos achados são concordantes com os obtidos por outros autores²¹, sugerindo a não utilização de oócitos com estas características morfológicas para os procedimentos de ICSI. Apesar de não termos evidências disponíveis, acreditamos que a presença de um CP aumentado possa estar associada a uma segregação desproporcional de mitocôndrias e proteínas, necessárias tanto para a ocorrência da fertilização normal, como para o desenvolvimento embrionário pré-implantação, o que precisa ser melhor elucidado.

No presente estudo, não se observou diferença significativa entre as taxas de fertilização, clivagem e de formação de embriões de boa qualidade resultantes da inseminação, por meio da ICSI, de oócitos com CP intacto e de tamanho normal ou CP fragmentado, sugerindo que a presença de fragmentação do 1º CP não interfere com estas variáveis. Nossos achados são similares a outros estudos publicados, nos quais também não foi evidenciada relação

entre fragmentação no 1º CP e as taxas de fertilização ou qualidade embrionária^{14,15,22}.

Temos indícios de que a fragmentação do 1º CP possa ser resultado do envelhecimento oocitário durante o cultivo *in vitro*⁸. Desta forma, diferentes protocolos de manipulação gamética e o intervalo de tempo entre a realização da captação dos oócitos, o desnudamento oocitário e a realização da ICSI podem ser os responsáveis pelas diferenças nas taxas de sucesso, e nos resultados controversos presentes na literatura, acerca da potencial influência da morfologia do 1º CP nas taxas de fertilização, qualidade embrionária e implantação subsequente. Da mesma forma, diferentes protocolos de estimulação ovariana e critérios de avaliação também podem contribuir para a divergência dos dados disponíveis na literatura, relativos ao valor prognóstico da morfologia do 1º CP nos resultados da ICSI.

Nossos dados sugerem que a presença do 1º CP aumentado relaciona-se com piores taxas de fertilização, de clivagem e de formação de embriões de boa qualidade, o que justifica a não utilização destes oócitos para

a realização da ICSI sempre que possível. Entretanto, a identificação de fragmentação no 1º CP parece não interferir nestas variáveis, não justificando a seleção oocitária e/ou embrionária a partir da análise deste parâmetro. Ressaltamos que diferentes protocolos de estimulação ovariana, particularidades de manipulação e cultivo oocitário e embrionário, diversificados critérios de análise, entre outros fatores, podem contribuir para os dados divergentes encontrados na literatura, o que precisa ser mais bem avaliado por meio de estudos com metodologia pertinente.

Agradecimentos

Agradecemos a contribuição das funcionárias do Laboratório de Reprodução Assistida: Maria Aparecida Carneiro Vasconcelos, Marilda Hatsumi Yamada Dantas, Roberta Cristina Giorgenon, Maria Auxiliadora Pádua Rosa e Sandra Aparecida Cavichiollo Viana, pelo apoio técnico para a realização do presente artigo.

Referências

1. De Santis L, Cino I, Rabellotti E, Calzi F, Persico P, Borini A, et al. Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(1):36-42.
2. Ebner T, Moser M, Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reprod Biomed Online*. 2006;12(4):507-12.
3. 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(6):1635-40.
4. Kahraman S, Yakin K, Dönmez E, Samli H, Bahçe M, Cengiz G, et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 2000;15(11):2390-3.
5. 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(10):2118-23.
6. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pflieger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod*. 2002;17(9):2415-8.
7. Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S. First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod*. 2004;19(10):2334-9.
8. Eichenlaub-Ritter U, Schmiady H, Kantenich H, Soewarto D. Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum Reprod*. 1995;10(9):2343-9.
9. Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, et al. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril*. In press 2008. 2008 Feb 4. [Epub ahead of print]
10. Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G. Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril*. 1999;72(4):599-603.
11. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 2000;15(2):427-30.
12. Ramalho-Santos J, Amaral A, Brito R, Freitas M, Almeida Santos T. Simultaneous analysis of cytoskeletal patterns and chromosome positioning in human fertilization failures. *Fertil Steril*. 2004;82(6):1654-9.
13. Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, et al. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod*. 2005;20(2):420-4.
14. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod*. 1997;12(8):1750-5.

15. 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(3):595-7.
16. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998;13(12):3431-3.
17. Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online.* 2006;12(5):608-15.
18. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril.* 2002;77(5):873-82.
19. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1993;8(7):1061-6.
20. Pickering SJ, Johnson MH, Braude PR, Houlston E. Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Hum Reprod.* 1988;3(8):978-89.
21. Martini E, Flaherty SP, Swann NJ, Payne D, Matthews CD. Analysis of unfertilized oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection using two rounds of fluorescence in-situ hybridization and probes to five chromosomes. *Hum Reprod.* 1997;12(9):2011-8.
22. Fancsovits P, Tóthné ZG, Murber A, Takács FZ, Papp Z, Urbancsek J. Correlation between first polar body morphology and further embryo development. *Acta Biol Hung.* 2006;57(3):331-8.