

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM EMBRIÕES EQUINOS PROVENIENTES DE INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDE (ICSI)

VERÔNICA FLORES DA CUNHA SCHEEREN

Botucatu, São Paulo Setembro/2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM EMBRIÕES EQUINOS PROVENIENTES DE INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDE (ICSI)

VERÔNICA FLORES DA CUNHA SCHEEREN

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Unesp, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa Co-orientadores: Prof^a. Dr^a Marta de Ruijter-Villani e Prof. Dr. Tom Stout

Botucatu – São Paulo Setembro/2022 FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM. DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Scheeren, Verônica Flores da Cunha. Instabilidade cromossômica em embriões equinos provenientes de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) / Verônica Flores da Cunha Scheeren. - Botucatu, 2022 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Orientador: Frederico Ozanam Papa Coorientador: Marta de Ruijter-Villani Coorientador: Tom Stout Capes: 50504002 1. Oócitos. 2. Éguas - Fertilização. 3. Aneuploidia. 4. Centrossomo. 5. Embriões. Palavras-chave: Aneuploidia; Centrossomo; Equino; Oócito; Zigoto.

Nome do autor (a): Verônica Flores da Cunha Scheeren

Data de Defesa: 21 de setembro de 2022.

Título: Instabilidade cromossômica em embriões equinos provenientes de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa Presidente e Orientador Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP - Botucatu / SP

Dra. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua Membro Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP - Botucatu / SP

Dra. Laíza Sartori de Camargo Membro Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP - Botucatu / SP

Prof^a. Dra. Milena da Silva Machado Membro Centro Universitário Sudoeste Paulista – UniFSP – Avaré / SP

Dr. Márcio Teoro do Carmo Membro Haras LUB Breeding – Cesário Lange / SP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ernesto Pedro Scheeren e Josefina da Cunha Scheeren, meus irmãos Augusto e Marôla, por todo o incentivo, apoio e amor dedicado a mim esses anos todos. Esta conquista dedico a vocês.

À minha tia, Maria Luiza, pelo amor insubstituível, sei que estás me cuidando daí de cima. Às minhas "filhas", Mulita e Guapa, minhas amadas.



AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, por sempre torcerem por mim nesta jornada e apoiarem minhas escolhas. Amo muito vocês.

À toda minha família, que mesmo de longe, sempre torceu por mim.

Ao meu orientador, Prof. Frederico Ozanam Papa, por todos esses anos de amizade e aprendizado. Muito obrigada por ter acreditado em mim de novo. Sempre terás minha admiração e respeito!

Aos meus co-orientadores Marta de Ruijter-Villani e Tom Stout, pela oportunidade única, convívio, ensinamentos e amizade. Vocês são incríveis, muito obrigada!

Ao Prof. Juan Cuervo-Arango, pela disponibilidade em ajudar e por ter me aberto as portas na Universidade de Utrecht.

Ao Prof. Marco Alvarenga, por todo incentivo, amizade e ensinamentos! És um grande amigo!

Aos meus amigos, Bruna, Sarah, Roberta, Aline, Marcos (Kbça), Mariana Andrade, Mariana Gobato, Ramona e Jordana, pela amizade e cumplicidade dedicada estes anos, vocês foram e são essenciais na minha vida!

Aos amigos, Eriky, Guilherme, Lorenzo, Lucas Canuto, Lucas Troncarelli, Pati, Rafa, Thaís, pela amizade que construímos e que me trouxeram muitas alegrias e ensinamentos.

À Tia Marilu e Tio Fran, que me acolheram em sua família e amenizaram a minha saudade de casa.

Aos amigos e colegas de Utrecht, Ainhoa, Claudia, Mabel, Bart, Umair, Leonie. Vocês são muito especiais! Muito obrigada por toda ajuda, execução de trabalhos, trocas de experiências e excelente convívio.

Aos amigos e professores João, Nereu, Fabiana, Marcos Watanabe, Zé Dell'Aqua, Camila e Márcio pela amizade e conhecimentos transmitidos.

À Universidade Federal de Santa Maria pela minha formação acadêmica, a todos os professores que participaram desta etapa e aos grandes amigos que fiz, Lucas, Mari, Jor, Gui, Carol, Mateus e Felipe, que até hoje os carrego no coração e sinto saudades.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu/SP pelas oportunidades oferecidas e pelo meu crescimento profissional.

À Universidade de Utrecht pela oportunidade única de realizar meu Doutorado-Sanduíche e todo desenvolvimento da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento DS e CAPES-PRINT (88882.433332/2019-01 e 88887.467895/2019-00), pela bolsa de Doutorado, fundamental à realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

COC: complexo *cumulus oophurus* FIV: fertilização *in vitro* ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozoide OPU: *ovum pick up* mL: mililitro; mM: milimolar; mm³: milímetro cúbico; mOsm: miliosmol; µL: microlitro; µm: micrômetro; °C: graus Celsius.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2 - Primeira divisão mitótica de um embrião equino. Os eventos da mitose se iniciam após a fusão do material genético dos gametas, dando origem a uma célula diploide (2n)......7

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Gametogênese	3
1.1. Oogênese e maturação oocitária <i>in vivo</i>	3
2. Fertilização	5
3. Primeira divisão mitótica	6
4. Fertilização <i>in vitro</i>	8
4.1 Obtenção dos oócitos	9
4.1.1 Recuperação de oócitos de folículos imaturos	10
4.1.2 Recuperação de oócitos de folículos pré-ovulatórios	11
4.1.3 Recuperação de oócitos de ovários excisados post mortem	12
4.2 Maturação oocitária <i>in vitro</i>	13
5. Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)	13
6. Desenvolvimento embrionário e fertilidade	15
7. Imunofluorescência e microscopia confocal	17
REFERÊNCIAS	19
HIPÓTESE	25
OBJETIVOS	25
CAPÍTULO 2	26
ARTIGO 1: VFC Scheeren, A Larreategui, M Beitsma, FO Papa, TAE Stout, M Ru	uijter-Villani.
Objects a second in stability in a surie s 1001 such music	

Chromosomal instability in equine ICSI embryos.

SCHEEREN, V.F.C. Instabilidade cromossômica em embriões equinos provenientes de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Botucatu
– SP. 58p. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) é um método estabelecido e amplamente utilizado para alcançar a fertilização de oócitos em tecnologias de reprodução assistida equina. A ICSI reúne diversas aplicações, como para éguas doadoras idosas, éguas que precisam ser sacrificadas ou que morrem repentinamente, animais com distúrbios do trato reprodutivo, sêmen de má qualidade, palhetas raras e/ou caras de sêmen congelado. No entanto, nem todos os oócitos fertilizados por ICSI sofrem clivagem e se desenvolvem em embriões viáveis. A primeira divisão mitótica no zigoto é bastante singular em comparação com a divisão mitótica em células somáticas. O oócito perde seus centríolos durante a oogênese e na fertilização, o espermatozoide reintroduz dois centríolos no oócito. Os mecanismos que impulsionam essas divisões pószigóticas propensas a erros ainda são pouco compreendidos. O objetivo deste estudo foi analisar a frequência e o tipo de defeitos de segregação cromossômica durante as primeiras divisões mitóticas de embriões de ICSI equinos. A imunofluorescência sistemática e a microscopia confocal foram realizadas em zigotos equinos fixados (n = 177 oócitos injetados) 24 horas após ICSI. Quarenta e nove zigotos estavam em mitose, 13 em fase pronuclear (26,5%), 11 em prófase ou pró-metáfase (22,4%), 14 em metáfase (28,5%) e 11 em anáfase ou telófase (22,4%). Os erros mais comuns observados nos zigotos em mitose foram centrossomos fragmentados e centrossomos mal posicionados. Concluímos que o centrossomo não é crucial para a montagem do fuso. Além disso, observamos uma alta incidência de fragmentação de material pericentrossomal. Isso poderia explicar por que os embriões de ICSI equinos ainda apresentam baixa eficiência quando comparados a outras espécies animais.

Palavras-chave: zigoto, centrossomo, oócito, aneuploidia, equino.

SCHEEREN, V.F.C. Chromosomal instability in equine ICSI embryos. Botucatu
– SP. 58p. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is an established and widely used method to achieve oocyte fertilization in equine assisted reproductive technologies. ICSI brings together several applications, such as for elderly donor mares, mares that need to be euthanized or that die suddenly, animals with reproductive tract disorders, poor quality semen due to, rare straws and/or frozen semen faces. However, not all ICSI-fertilized oocytes undergo cleavage and develop into viable embryos. The first mitotic division in the zygote is guite unique compared with mitotic division in somatic cells. The oocyte loses its centrioles during oogenesis and at fertilization, the sperm cell re-introduces two centrioles into the oocyte. The mechanisms driving these error-prone post-zygotic divisions are still poorly understood. The objective of this study was to analyze the frequency and type of chromosome segregation defects during the early mitotic divisions of equine ICSI embryos. Systematic immunofluorescence and confocal microscopic was performed in fixed equine zygotes (n= 177 injected oocytes) 24hours after ICSI. Forty nine zygotes were undergoing mitosis: 13 at pronuclear stage (26,5%), 11 at prophase or pro-metaphase (22,4%), 14 at metaphase (28,5%) and 11 at anaphase or telophase (22,4%). The most common errors observed in the zygotes undergoing mitosis were fragmented centrosomes and mispositioned centrosomes. We conclude that the centrosome is not crucial for spindle assembly. Also, we observed a high incidence of pericentrosomal material fragmentation. This could explain why equine ICSI embryos still have low efficiency in when compared to others animal species.

Key-words: zygote, centrosome, oocyte, aneuploidy, horse.

"Uma criança, um professor,

Um livro e um lápis

Podem mudar o mundo."

Malala Yousafzai.



INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida em equinos vem crescendo exponencialmente em todo o mundo, onde as técnicas de inseminação artificial e transferência de embriões produzidos *in vivo* ocupam lugar de destaque. Todavia, técnicas como a fertilização *in vitro* (FIV), a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e a clonagem em equinos, ainda apresentam resultados inferiores quando comparadas com outras espécies domésticas (Galli et al., 2014). A fertilização *in vitro*, de modo convencional, ainda não é eficiente em equinos, devido, principalmente, a dificuldade em induzir a capacitação espermática *in vitro*. Como alternativa, a partir da ICSI é possível fertilizar oócitos equinos *in vitro* com boas taxas de sucesso.

Para aplicação desta biotecnologia, o método mais empregado para obtenção de oócitos é através da aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal (OPU). A partir deste procedimento é possível aspirar folículos imaturos e / ou pré-ovulatórios, podendo ser realizada ao longo de todo o ano e devolvendo o potencial de reprodutivo de éguas subférteis ou inférteis. Ainda, pode-se recuperar oócitos de ovários excisados de éguas *post mortem*, como uma última alternativa de armazenamento de material genético.

A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) é um método estabelecido e amplamente utilizado para alcançar a fertilização de oócitos em tecnologias de reprodução assistida equina. No entanto, nem todos os oócitos fertilizados por ICSI sofrem clivagem e se desenvolvem em embriões viáveis. As taxas de produção de blastocisto por OPU-ICSI estão, em média, 1 - 1,5blastocisto por procedimento (Cuervo-Arango et al., 2019), cujas causas de parada no desenvolvimento embrionário precoce durante a progressão do zigoto após ICSI ainda não estão elucidadas, uma vez que são decisivas para o sucesso da prenhez.

Com a finalidade de avaliar o desenvolvimento embrionário em equinos, o parâmetro mais significativo é o tempo de clivagem, que ocorre entre 12 e 24 horas após a ICSI (Carnevale e Sessions, 2012). Embriões que clivam mais rápido são mais propensos a resultar em prenhez do que embriões que clivam em ritmo mais lento, o que também é verdade em outras espécies (Lundin et al. 2001). A primeira divisão mitótica no zigoto é bastante singular em comparação com a divisão mitótica em células somáticas. No zigoto estão presentes dois pronúcleos em vez de um único núcleo, o citoplasma é extremamente grande em comparação com uma célula somática e o mecanismo dominante de nucleação de microtúbulos é acionado pelos centríolos paternos e material pericentriolar materno, originando dois centrossomos. Todas essas diferenças provavelmente desempenham um papel importante em tornar o zigoto suscetível a erros de segregação cromossômica.

Até o momento, o conhecimento é limitado sobre as primeiras 24 horas de desenvolvimento do zigoto equino e as mudanças no oócito que ocorrem quando os genomas feminino e masculino se encontram. Erros na aposição dos dois conjuntos de cromossomos, assincronia da remodelação nuclear e citoplasmática e modificações epigenéticas zigóticas ocorrem antes da primeira clivagem mitótica, podendo causar perda embrionária precoce e falha gestacional.

O objetivo desta revisão é elucidar sobre os aspectos referentes à primeira divisão celular de um embrião equino, desde os processos iniciais de gametogênese até os eventos pós-fertilização. Ainda, objetiva-se abordar sobre as técnicas de fertilização *in vitro* utilizadas na espécie equina, com foco principal para injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), bem como seus desafios para obtenção de blastocistos viáveis.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Gametogênese, oogênese e maturação oocitária in vivo

A gametogênese é conhecida como o processo de desenvolvimento dos gametas feminino (oócitos) e masculino (espermatozoides). Cada gameta formado carrega o material genético e todo o material necessário para iniciar e manter o metabolismo e desenvolvimento embrionário.

As oogônias, células precursoras dos oócitos, proliferam por sucessivas mitoses durante a fase inicial da gestação. Aproximadamente no terço final de desenvolvimento fetal, o número de células germinais declina rapidamente. A maioria das oogônias entram em apoptose nesta fase, enquanto que as restantes entram na primeira divisão meiótica originando os oócitos primários, que se mantêm em prófase da meiose I até que a fêmea atinja a puberdade. Quando a puberdade é atingida, os oócitos completam a meiose I, iniciam a segunda divisão meiótica, que só será finalizada após a fertilização por um espermatozoide (Bloom e Fawcett, 1994).

Durante a puberdade, o folículo primário aumenta de tamanho, devido a proliferação das células à sua volta, aumentando o diâmetro do folículo. Começa a formar-se uma cavidade, denominada de antro, na massa de células granulosas, que é preenchida por um fluido, o líquido folicular. O oócito fica ligeiramente afastado do centro com o aumento do antro, e os folículos passam a ser chamados de folículos secundários ou folículos antrais. A maioria dos folículos que se desenvolve até folículos antrais vão degenerar e entrar em atresia. O restante continuará o seu processo de crescimento até à ovulação (Bloom e Fawcett, 1994).

O oócito presente nos folículos secundários não cresce mais, porém o número de células da granulosas do folículo continua a aumentar, até se tornar um folículo maduro pré-ovulatório ou de Graaf. Antes da ovulação, o núcleo do oócito perde o invólucro nuclear, os cromossomas condensam e migram para a periferia, entrando em metáfase I (Figura 1). O oócito da metáfase I transita da anáfase I para a telófase I, ocorrendo uma citocinese desigual, com a formação de primeiro corpúsculo polar (Junqueira e Carneiro, 2004). O oócito fica então estacionado em metáfase da segunda divisão meiótica aguardando a fertilização e, se for fecundado, volta a dividir-se (meiose II) formando o segundo corpúsculo polar (Chen et al., 2010, Carnevale e Maclellan, 2006).

Todo este processo de oogênese, maturação oocitária e ovulação é hormônio dependente. Na égua, o crescimento e maturação dos folículos acontece por estimulo do hormônio folículo estimulante (FSH). Já a maturação final do oócito ocorre dentro do folículo dominante pré-ovulatório cerca de 24 a 36 h antes da ovulação, devido ao estímulo do hormônio luteinizante (LH) (Hinrichs et al., 1993). Durante o ciclo estral, a concentração de LH sofre um aumento progressivo, que culmina na ruptura do folículo dominante e expulsão do oócito, evento este conhecido por ovulação (Evans, Irvine, 1975, Bézard et al., 1989, Hinrichs et al., 1993).



Figura 1: Meiose oocitária. A meiose oocitária é dividida em duas fases, meiose I e II, o objetivando a formação do gameta feminino, uma célula haploide (n). Fonte: BioRender, 2022.

2. Fertilização

A fertilização é o processo durante o qual duas células haploides, o gameta masculino e feminino, se fundem na tuba uterina para originar um ovo ou zigoto, uma célula diploide, geneticamente distinta dos progenitores (Bloom, 1994). O oócito tem o seu material genético parado em metafase II da meiose e está rodeado por uma camada glicoproteica, a zona pelúcida. Na tuba uterina, a matriz extracelular, rica em ácido hialurônico, que rodeia as células foliculares difunde uma molécula que origina um gradiente quimiotáxico para orientar os espermatozoides em direção ao oócito (Bloom, 1994).

A entrada do espermatozoide no oócito, cujo material genético se encontra parado em metáfase II, desencadeia a conclusão da segunda divisão meiótica do oócito. Para que a fertilização prossiga, uma série de mudanças citoplasmáticas e nucleares devem ocorrer de forma sequencial. As mudanças na estrutura nuclear incluem a formação dos pronúcleos masculino e feminino (PNs), migração e aposição desses pronúcleos e mistura dos genomas materno e paterno. Finalmente, haverá o início de uma divisão mitótica e do desenvolvimento embrionário (Yanagimachi, 1994).

Cerca de 3 horas após a penetração da célula espermática, a maioria dos oócitos faz a extrusão do segundo corpúsculo polar. A formação dos pronúcleos tem início entre 3 a 10 horas após a fusão dos gametas (Capmany,

1996). O pronúcleo masculino aparece geralmente na parte central, enquanto que o feminino se forma no ooplasma adjacente ao segundo corpúsculo polar. Apesar de existirem intervalos de tempos tão variáveis entre os vários embriões, na maioria das espécies, a ruptura dos invólucros pronucleares e a primeira mitose acontecem entre 27 e 30h e entre 29 e 32h, respectivamente (Capmany, 1996).

Para que os eventos nucleares ocorram, a reorganização dos elementos microtubulares e microfilamentares dos gametas fertilizantes é imprescindível. Ao longo da oogênese, o oócito perde seus centríolos, tendo material pericentriolar (PCM) como centro formador de microtúbulos e fuso meiótico. Na peça intermediária do espermatozoide estão dois centríolos, bem como um material pericentriolar especializado. O centríolo proximal (PC) é encontrado próximo à base da cabeça, e o centríolo distal (DC) está localizado mais distante da cabeça, ligado à base do axonema (Avidor-Reiss et al., 2019).

Durante a fertilização, o espermatozoide reintroduz dois centríolos, organela que atua como um centro organizador de microtúbulos (MTOCs), no citoplasma do oócito, que se multiplicam, induzindo a formação de uma estrutura contendo microtúbulos radiais, que coordena a migração e união dos dois pronúcleos e a formação do fuso mitótico (Schatten, 1994). Essa herança paterna dos centríolos é vista na maioria das espécies de mamíferos estudadas, incluindo humanos (Simerly et al., 1999), equinos (Tremoleda et al., 2001), bovinos (Shin et al., 2002), suínos (Dai et al., 2000).

3. Primeira divisão mitótica

A primeira mitose no zigoto é bastante singular em comparação com a divisão mitótica em células somáticas. No zigoto estão presentes dois pronúcleos em vez de um único núcleo, o citoplasma é extremamente grande em comparação com uma célula somática e o mecanismo dominante de nucleação de microtúbulos é acionado pelos centríolos paternos e material pericentriolar materno, originando dois centrossomos. Todas essas diferenças desempenham, provavelmente, um papel importante em tornar o zigoto suscetível a erros de segregação cromossômica (Reichmann et al., 2018). Com base no estado físico dos cromossomos e do fuso a mitose é dividida em cinco

fases: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase. A citocinese é a divisão celular física final que segue a telófase e, portanto, às vezes é considerada uma sexta fase da mitose (Figura 2).

A mitose começa com a prófase, durante a qual os cromossomos começam a sofrer um processo de condensação que continuará até a metáfase. Na maioria das espécies, a coesina é amplamente removida dos braços das cromátides irmãs durante a prófase, permitindo que as mesmas possam se separar. Durante a prófase, o fuso mitótico também começa a se formar à medida que os dois pares de centríolos se movem para polos opostos e os microtúbulos começam a polimerizar a partir dos centrossomos (O'Connor, 2008).



Figura 2: Primeira divisão mitótica de um embrião equino. Os eventos da mitose se iniciam após a fusão do material genético dos gametas, dando origem a uma célula diploide (2n). Fonte: arquivo pessoal.

A prometáfase começa com a fragmentação abrupta do envelope nuclear, sendo um passo essencial para a montagem do fuso. Como os centrossomos estão localizados fora do núcleo, os microtúbulos do fuso em desenvolvimento não têm acesso aos cromossomos até que a membrana nuclear se separe. Os microtúbulos se desenvolvem a partir dos centrossomos, procurando locais de fixação nos cinetocoros cromossômicos, que são uma espécie de disco de proteínas localizado no centrômero. À medida que a prometáfase ocorre, os cromossomos adotam uma bi-orientação, o que significa que os cinetócoros nas cromátides irmãs estão conectados por microtúbulos aos polos opostos do fuso (Cheeseman, Desai, 2008).

Em seguida, na metáfase, os cromossomos assumem seu estado mais compacto, quando os centrômeros de todos os cromossomos da célula se alinham no equador do fuso, e param temporariamente de se mover durante a esta fase. Um mecanismo complexo de *checkpoint* determina se o fuso está montado corretamente e, na maioria das vezes, apenas células com fusos montados corretamente entram em anáfase (Mitchison, Salmon, 2001).

A anáfase é marcada pela separação abrupta das cromátides irmãs. Durante a primeira parte da anáfase, os microtúbulos do cinetocoro encurtam e os cromossomos se movem em direção aos pólos do fuso. Durante a segunda parte da anáfase, os pólos do fuso separam-se à medida que os microtúbulos não cinetócoros se movem uns sobre os outros (Mitchison, Salmon, 2001). Os mecanismos moleculares que desencadeiam a separação das cromátides irmãs envolvem proteases que degradam a coesina, como a separasse (Karki et al., 2017) proteínas motoras que conectam microtúbulos com polaridade oposta e então "caminham" em direção ao final dos microtúbulos (O'Connor, 2008).

A mitose termina com a telófase, o estágio em que os cromossomos atingem os polos da célula. A membrana nuclear então se reforma e os cromossomos começam a se descondensar em suas conformações interfásicas. A telófase é seguida pela citocinese, ou a divisão do citoplasma em duas células filhas, que tem composições genéticas idênticas (O'Connor, 2008).

4. Fertilização in vitro

O desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida em equinos, como a fertilização *in vitro* (FIV), a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e a clonagem, tem sido relativamente lento em comparação com outras espécies domésticas como ruminantes e suínos (Galli et al., 2007). A fertilização *in vitro*, de modo convencional, geralmente é realizada a partir da co-incubação de oócitos com espermatozoides capacitados, porém na espécie equina esse procedimento ainda não é eficiente. No entanto, é possível fertilizar oócitos equinos *in vitro* a partir da técnica de ICSI (Hinrichs et al., 2005).

Os primeiros relatos de produção *in vitro* de embriões equinos, seja por fertilização *in vitro* convencional ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides datam, respectivamente, de aproximadamente 30 e 25 anos atrás. Fatores como a baixa probabilidade de sucesso e o custo elevado a tornavam economicamente inviável a criação de cavalos. No entanto, na última

década a produção *in vitro* de embriões se estabeleceu na prática clínica, principalmente devido a melhorias significativas na eficiência de recuperação de oócitos imaturos de éguas doadoras vivas, que antes giravam em torno de <25% e agora >50%, e na cultura bem-sucedida de zigotos até o estágio de blastocisto, cerca de <10% anteriormente e agora >20% (Stout, 2020).

A otimização de etapas pré e pós procedimento de ICSI vieram a somar a esta técnica de reprodução assistida. Foi estabelecido que oócitos imaturos podem ser mantidos à temperatura ambiente por pelo menos 24 horas, permitindo o transporte para um laboratório onde a ICSI será realizada (Galli et al., 2016). Além disso, os embriões produzidos *in vitro* podem ser criopreservados sem redução apreciável na viabilidade, podendo ser enviados e armazenados até que uma égua receptora adequada esteja disponível para transferência. Atualmente, as taxas de produção de blastocistos excedem 1 por procedimento e as taxas de parto pós-transferência excedem 50%, de modo que a eficiência geral é melhor do que a lavagem de embriões ou oócitos transferir (Rader et al., 2016, Cuervo-Arango et al., 2019a).

Para realização da ICSI comercialmente, os oócitos são obtidos na grande maioria a partir da aspiração folicular via transvaginal (OPU). A combinação destas duas técnicas, OPU-ICSI, reúne diversas vantagens, dentre elas a possibilidade de ser realizada durante todo o ano; permite a produção de embriões de éguas com subfertilidade adquirida grave e uso extremamente eficiente de sêmen congelado escasso ou caro (Stout, 2020). Também, é possível recuperar os oócitos de éguas que foram sacrificados ou morreram subitamente como última alternativa para armazenamento de material genético (Hinrichs, 2012).

4.1 Obtenção de oócitos

Existem três principais abordagens para recuperar oócitos de éguas: recuperação de oócitos imaturos de todos os folículos do ovário; ou recuperação do oócito em maturação do folículo pré-ovulatório dominante após a administração de hCG ou um análogo de GnRH, ambas as técnicas podendo serem feitas em éguas vivas por aspiração folicular guiada por ultrassom transvaginal. Ainda, é possível recuperar oócitos de ovários excisados de éguas *post mortem*, a partir da raspagem e lavagem vigorosa dos folículos.

4.1.1 Recuperação de oócitos de folículos imaturos

A aspiração de folículos imaturos é uma técnica bastante utilizada por diversas equipes ao redor do mundo. Inicialmente, na década de 90, as taxas de recuperação eram muito baixas, girando em torno de ≤25% (Hinrichs, 2012), enquanto que a aspiração de folículos pré-ovulatórios propiciava resultados acima de 70% de recuperação (Carnevale et al., 2005).

Porém, ao se avaliarem as características histológicas do folículo equino, foi possível observar uma forte fixação do oócito à parede do folículo, sendo possível concluir que a simples aspiração do líquido folicular não seria suficiente para recuperar os oócitos (Hawley et al., 1995). A partir daí, o aprimoramento da técnica, combinando a aspiração do líquido folicular, a lavagem repetida do lúmen (5 a 10 vezes) e a raspagem vigorosa da parede do folículo, utilizando uma agulha em bisel de lúmen grande (calibre 12), geralmente duplo (lúmen interno para aspiração, externo para lavagem), trouxe uma taxa de recuperação de oócitos clinicamente aceitável (>50%) (Galli et al., 2007, Cuervo-Arango et al., 2019b).

Com esta técnica, todos os folículos presentes no ovário, acima de 3-5mm, podem ser aspirados. O tamanho do folículo parece influenciar a probabilidade de recuperação de um oócito, cuja taxa de recuperação é mais alta quando a maior porcentagem de folículos aspirados tem menos de 10 mm de diâmetro, presumivelmente porque a raspagem mecânica da parede do folículo é mais eficiente em um folículo menor (Stout, 2020). Ainda, o número de folículos aspirados é influenciado por características raciais, explicando por que a recuperação média de oócitos varia acentuadamente entre os relatórios (de <5 a >12 oócitos por OPU) (Galli et al., 2014, Cuervo-Arango et al., 2019b). Em média, nas raças Árabe, Quarto de Milha e Warmblood se observam médias de aproximadamente 17, 14 e 15 folículos aspirados por OPU (Galli et al., 2014). Outro fator que interfere na recuperação oocitária é a frequência de das aspirações foliculares, pois o número de folículos diminui quando a aspiração é realizada em intervalos inferiores a 11 dias (Hinrichs, 2012). Mais um ponto vantajoso desta técnica é que, após a OPU, a manipulação dos oócitos imaturos se faz em temperatura ambiente, uma vez que estes são surpreendentemente tolerantes ao manuseio e manutenção em temperaturas ao redor de 22°C (Choi et al., 2006). Essa característica permite que o armazenamento em meios de manutenção de embrião, e o transporte destes gametas em temperatura ambiente (20-22°C) por no máximo 24 horas, até um laboratório para o procedimento de ICSI, possa ser realizado sem causar prejuízos às taxas de maturação *in vitro* e produção de blastocistos (Galli et al., 2016, Stout, 2020).

4.1.2 Recuperação de oócitos de folículos pré-ovulatórios

Outro método bastante empregado é a aspiração de folículos préovulatórios, cujos oócitos já se encontram em estágio de maturação mais avançado. Para que a maturação oocitária ocorra, as éguas tem o ciclo estral monitorado, e quando possuem um, ou ocasionalmente, dois folículos dominantes com ±35mm, é feita a administração de gonadotrofinas (hCG ou análogo de GnRH). A aspiração deve ser feita pelo menos 24 horas após o tratamento, para permitir a expansão das células do cumulus, e não mais que 35 horas, para que a ovulação não ocorra antes da aspiração (Hinrichs, 2012).

Um ponto crítico desta técnica é o baixo número de oócitos recuperados, uma vez que apenas folículos pré-ovulatórios são aspirados (Stout, 2020), apesar disso a taxa de recuperação oocitária está entre 65-80% (Hinrichs, 2012). Pensando numa tentativa de aumentar esses números, o uso de fármacos que estimulem o crescimento múltiplo de folículos não é uma realidade, pois ainda não há gonadotrofinas comercialmente disponíveis capazes de estimular de forma confiável o desenvolvimento de múltiplos folículos pré-ovulatórios na égua, o que significa que apenas 1 ou 2 folículos pré-ovulatórios em desenvolvimento natural por ciclo estariam disponíveis para recuperação de oócitos maduros (Stout, 2020). Além disso, ovários com múltiplos folículos pré-ovulatórios podem ser demasiado grandes para eficazmente manipular durante a aspiração (Maclellan et al., 2002).

Após a aspiração, o oócito é incubado até o momento previsto em que a égua doadora teria ovulado se o folículo não tivesse sido aspirado. Assim, se um

oócito é coletado 24 h após a estimulação com gonadotrofina, ele é incubado 12-18 h antes da manipulação; se for coletado 35 h após a estimulação com gonadotrofina, pode ser incubado 1-7 h antes da manipulação (Hinrichs, 2012). Aqui, é de suma importância que toda a manipulação seja o mais próximo da temperatura fisiológica de uma égua, pois os oócitos já iniciaram seu processo de maturação e são extremamente sensíveis a oscilações de temperatura. Caso o transporte desses gametas se faça necessário, o armazenamento em uma incubadora portátil é mandatório para o bom sucesso da técnica (Hinrichs, 2012).

4.1.3 Recuperação de oócitos de ovários excisados post mortem

Em casos de morte inesperada, doenças crônicas ou procedimentos cirúrgicos que culminam com a eutanásia, ou pesquisa, a recuperação de oócitos de ovários excisados é uma técnica bastante utilizada, com potros nascidos a partir de casos clínicos *post mortem* onde a ICSI foi realizada (Carnevale et al., 2004, Hinrichs et al., 2012). Após a morte da égua, é recomendado que os ovários sejam removidos da égua o mais rápido possível, uma vez que a produção de blastocistos é superior quando os oócitos são recuperados dentro de 6-8h (Ribeiro et al., 2005). Todavia, em casos de atraso ainda pode ser possível obter sucesso (Carnevale et al., 2003). Os ovários devem ser armazenado em caixa isotérmica a uma temperatura de 21-25°C (Rizzo et al., 2019).

Para recuperar oócitos dos folículos de ovários equinos excisados, o método mais eficaz, porém demorado, é conhecido como *scraping*. Essa técnica consiste em abrir completamente cada folículo visível ou palpável usando um bisturi, e alternar a raspagem de toda a superfície interna do folículo, com uma cureta óssea para remover a camada de células da granulosa, com a lavagem dessa cavidade com meio específico para recuperação de oócitos (Rizzo et al., 2019). Depois que todos os folículos visíveis forem processados, o ovário é cortado em fatias de 5 mm e quaisquer folículos revelados também são raspados. A partir deste procedimento é recuperar oócitos com boa competência meiótica, capazes de completarem sua maturação *in vitro* (Hinrichs et al. 2005; Choi et al., 2007).

4.2 Maturação oocitária in vitro

A coleta de oócitos equinos imaturos e a maturação *in vitro* são utilizadas para superar o número limitado de oócitos maduros que podem ser obtidos a partir de folículos pré-ovulatórios dominantes. O primeiro relato de sucesso de oócitos equinos maturados *in vitro* foi em 1981, seguido pelo primeiro embrião produzido de um oócito equino maturado *in vitro* em 1989 (Fulka, Okolski., 1981, Zhang et al., 1989).

A tecnologia de maturação oocitária *in vitro* foi estabelecida, em parte devido ao uso de ICSI para fertilização *in vitro* (Galli et al., 2013). Este processo envolve principalmente a adição de gonadotrofinas e soro para meios de cultura complexos, onde os oócitos são mantidos em atmosfera controlada de 5% de CO₂ em ar a 38,5°C por 24-30 h (Carnevale, Sessions, 2012, Rizzo et al., 2019, Rizzo et al., 2020). Após este período, a avaliação da maturidade oocitária, feita por imagem do primeiro corpúsculo polar extrudado, é necessária para determinar se o oócito está ou não apto a ser fertilizado (Dell'Aquila et al., 2003).

5. Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)

A injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) é a técnica mais comum utilizada para fertilizar o oócito equino, em que um espermatozoide selecionado é injetado diretamente no citoplasma do oócito. A fertilização *in vitro* convencional no cavalo é ineficiente e inconsistente devido à falha do espermatozoide equino em penetrar eficientemente na zona pelúcida do oócito *in vitro*, especialmente pela incapacidade de desencadearmos a capacitação espermática a nível laboratorial (Leemans et al., 2016). Por estas razões, para fertilizar com sucesso oócitos equinos *in vitro*, a ICSI é a única técnica consistentemente replicável (Carnevale, Sessions, 2012). A primeira prenhez derivada de maturação *in vitro* de oócitos equinos e fertilização por ICSI foi em 1996 (Squires et al., 1996), em que quatro oócitos foram fertilizados e uma prenhez foi obtida.

O procedimento de ICSI envolve a seleção de um oócito viável, geralmente derivado do folículo imaturo ou pré-ovulatório. O oócito precisa estar na metáfase II da meiose para ser competente e ser fertilizado com sucesso, sendo selecionados para fertilização os oócitos com um corpúsculo polar visível. A seleção dos espermatozoides para ICSI é realizada por diferentes métodos e depende da qualidade do sêmen e do protocolo de diferentes laboratórios (Hinrichs, 2012). Um espermatozoide morfologicamente normal e progressivamente móvel é selecionado para injeção do oócito. Para que o oócito possa ser injetado, o mesmo é desnudado das células do cumulus utilizando meio de cultivo acrescido de hialuronidase, seguido de pipetagem (Carnevale, Sessions, 2012).

Para a execução desta técnica, um micromanipulador é utilizado. Durante a injeção, o oócito é mantido em uma posição onde o corpúsculo polar esteja em 6 ou 12 horas, e a agulha contendo o espermatozoide em seu interior é inserida em posição de 3 ou 9 horas. Com isso, objetiva-se que ao ingressar com a agulha no citoplasma do oócito, nenhum dano seja causado ao material genético desta célula. Para a injeção, a zona pelúcida é perfurada, se rompe a membrana citoplasmática, o espermatozoide é então liberado, incluindo a cauda (Squires et al., 1996). Depois que o oócito é injetado, a cultura do possível zigoto é necessária para obter clivagem e produzir blastocistos viáveis.

Para cultivar os possíveis zigotos, o sistema mais comumente utilizado é o meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino (FBS) mantidos em incubadora a 5% de CO₂ em ar a 38,5°C (Hinrichs, 2005, Galli et al., 2013). Entre os dias 5 e 7 após ICSI, a naqueles embriões que se desenvolvem normalmente será observada a formação da blastocele (Carnevale, Sessions, 2012). Quando comparados embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, é possível perceber uma grande diferença no tamanho dos mesmos. Ao comparar a contagem de células entre embriões cultivados *in vivo* e *in vitro* no dia 7 após a ICSI, observa-se menor número de células em embriões produzidos *in vitro* (Tremoleda et al., 2003, Galli et al., 2013). Este atraso no desenvolvimento de blastocistos após ICSI provavelmente é causado por danos na membrana, fragmentação de núcleos e possível apoptose de blastômeros (Tremoleda et al., 2003).

Com a finalidade de avaliar o desenvolvimento embrionário em equinos, o parâmetro mais significativo é o tempo de clivagem, que ocorre entre 12 e 24 horas após a ICSI (Carnevale, Sessions, 2012). Embriões que clivam mais rápido são mais propensos a resultar em prenhez do que embriões que clivam em ritmo mais lento, o que também é verdade em outras espécies (Lundin et al., 2001). Até o momento, o conhecimento é limitado sobre as primeiras 24 horas de desenvolvimento do zigoto equino e as mudanças no oócito que ocorrem quando os genomas feminino e masculino se encontram. Erros na aposição dos dois conjuntos de cromossomos, assincronia da remodelação nuclear e citoplasmática e modificações epigenéticas zigóticas ocorrem antes da primeira clivagem mitótica, podendo causar perda embrionária precoce e falha gestacional.

6. Desenvolvimento embrionário e fertilidade

As duas etapas limitantes para um programa de produção de embriões equinos *in vitro* são o fato de que uma porcentagem relativamente pequena de oócitos injetados se transforma em blastocisto; e uma menor taxa de prenhez após a transferência de um embrião produzido *in vitro* em comparação com um *in vivo*. Nos últimos anos, as taxas de produção de blastocisto por OPU - ICSI de oócitos maturados *in vitro* subiram de 10 para 40% (Hinrichs, 2005, Rader et al., 2016) e hoje atingem cerca 60% em programas comerciais, com média de 1,3-1,8 embriões por égua por sessão de OPU - ICSI (Jacobson et al., 2010, Claes et al., 2016).

As taxas de prenhez após a transferência de embriões produzidos *in vitro* variam consideravelmente entre os centros, com relatos de sucesso que variam entre 50% e 80%. Por outro lado, 16 a 25% dessas gestações sofrem morte embrionária ou fetal antes do 60° dia de gestação, de modo que as taxas de transferência de potros vivos por embrião variam entre 30 e 70% (Rader et al., 2016, Cuervo-Arango et al., 2018, Claes et al., 2019). Obviamente, que a ICSI não é a única causa da perda embrionária / fetal, mas é uma das principais fontes de ineficiência e perda econômica. Essa variabilidade nas taxas de prenhez e na incidência de perda embrionária precoce, pode ser influenciado por diversas razões, desde a capacidade de identificar e selecionar blastocistos competentes (Tremoleda et al., 2003), até a sincronia e fertilidade das éguas receptoras usadas.

Existem várias causas que podem levar a perda gestacional precoce, como irregularidades no ambiente uterino (Claes et al., 2019) e anormalidades intrínsecas do embrião, por exemplo, desenvolvimento retardado, maior incidência de células apoptóticas ou competência de desenvolvimento reduzida (Cuervo-Arango et al., 2018). Quando ambas as causas foram comparadas, foi possível observar que os defeitos embrionários intrínsecos são mais prováveis de serem responsáveis pela maioria das perdas de gestação em éguas envelhecidas e subférteis (Ball et al., 1987).

Os primeiros cinco dias de desenvolvimento são o período mais importante para a formação de um blastocisto. Aproximadamente 25% dos oócitos injetados interrompem seu desenvolvimento no dia 1, enquanto 25-30% são perdidos em cultura durante os primeiros dias de desenvolvimento *in vitro* (Amargant et al., 2018). Em humanos e cavalos, a aneuploidia embrionária é reconhecida como um importante contribuinte para a interrupção do desenvolvimento e aborto espontâneo (Maxwell et al. 2016; Shilton et al., 2020), acredita-se que a aneuploidia surja durante as divisões mitóticas do embrião, no entanto, as origens celulares da aneuploidia mitótica permanecem obscuras (Cavazza et al., 2021).

Uma descrição completa dos movimentos do genoma parental em zigotos equinos após ICSI foi realizada usando microscopia confocal (Tremoleda et al., 2003). Este estudo caracterizou eventos nucleares e citoesqueléticos após ICSI, particularmente observando as mudanças morfológicas nas primeiras 48 h após a injeção do espermatozoide. Logo, foi possível observar que a parada do zigoto e assincronia entre gametas masculinos e femininos durante a fertilização podem levar à parada embrionária precoce.

Um estudo mais recente buscou avaliar os eventos após a fertilização por ICSI de oócitos maturado *in vivo* e *in vitro*, sendo observadas as potenciais alterações citoesqueléticas e nucleares antes da primeira divisão mitótica em intervalos de tempo até 16 h pós-fertilização. Observou-se que ambos os métodos de maturação apresentaram uma progressão normal, porém os que maturaram *in vivo* tiveram uma progressão mais rápida e com menos anormalidades, do que os que maturaram *in vitro* (Ruggeri et al., 2017.) Com isso, é possível compreender que a maturação *in vitro* é um processo bastante desafiador para o oócito e que afeta diretamente no seu potencial de fertilidade.

Além destes trabalhos, não houve melhora substancial nos estudos voltados à primeira divisão mitótica de zigotos equinos, com a finalidade de elucidar as principais falhas no processo de divisão celular, que culminam com atraso ou parada no desenvolvimento embrionário.

7. Imunofluorescência e microscopia confocal

A coloração imunofluorescente é um método eficaz para pesquisar estruturas ou moléculas específicas, podendo combinar métodos imunológicos e a fluorescência. Para visualizar as estruturas ou moléculas de interesse com um microscópio de fluorescência ou microscópio confocal, os anticorpos são conectados com grupos fluoróforos quimicamente estáveis (Chen et al., 2010). Existem dois métodos diferentes de imunofluorescência, um método direto e um método indireto. A imunofluorescência direta conjuga o fluoróforo diretamente a um anticorpo primário, este método é rápido, mas não prático porque o sinal não é intenso. A imunofluorescência indireta conjuga o fluoróforo em um anticorpo secundário que está ligado ao anticorpo primário, este método adquire um sinal mais evidente (Krizaic et al., 2015).

A microscopia de fluorescência é uma técnica importante em biologia celular, para observar a fisiologia celular, mas também visualizar a dinâmica do tecido e a atividade das células (Chen et al., 2010). Esta técnica implica fluoróforos absorventes de luz com um comprimento de onda específico. Os componentes celulares podem ser marcados com anticorpos, que são emparelhados com corantes fluorescentes para localizar componentes específicos das células (Ewers, 2012).

O oócito equino é uma célula grande, com aproximadamente 140 µm de diâmetro, com alto teor de lipídios para energia metabólica (Ambruosi et al., 2009). Essas propriedades do oócito equino afetam a imunocoloração e a imagem confocal. A primeira imagem detalhada da progressão precoce do embrião equino após ICSI de oócitos maturados *in vitro* foi publicada em 2003, em que alguns zigotos equinos produzidos por ICSI foram avaliados com microscopia confocal (Tremoleda et al. 2003). Ainda, como essas amostras são difíceis e onerosos de se obter, esta técnica fornece um método eficiente para obter imagens de amostras limitadas (Figura 3). Sendo assim, a microscopia confocal pode ser um método eficaz para analisar o oócito e o zigoto equinos.



Figura 3: Zigotos equinos imunocorados e avaliados por microscopia confocal em diferentes estágios da primeira divisão mitótica. A: fase de pronúcleos. B: metáfase. C: anáfase. D: duas células. Fonte: arquivo pessoal.

7. Considerações finais

As técnicas de fertilização *in vitro* para espécie equina ainda se mostram desafiadoras e as taxas bastante oscilantes, sendo a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) a que apresenta os melhores resultados. Aspectos referentes à primeira divisão celular de um embrião equino, desde os processos iniciais de gametogênese até os eventos pós-fertilização ainda precisam ser estudos a fundo, objetivando elucidar as alterações que levam a baixas taxas de blastocistos viáveis.

REFERÊNCIAS

AVIDOR-REISS, T., MAZUR, M., FISHMAN, E. L., SINDHWANI, P. The role of sperm centrioles in human reproduction-the known and the unknown. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v.7, p.188, 2019.

BALL, B.A., HILLMAN, R.B., WOODS, G.L. Survival of equine embryos transferred to normal and subfertile mares. **Theriogenology**, v28, n.16, 1987.

CUERVO-ARANGO, J., CLAES, A.N., STOUT, T.A. Effect of Embryo-Recipient Synchrony on Post-ET Survival of In Vivo and In Vitro-Produced Equine Embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.66, p.163-164, 2018.

BLOOM, W., FAWCETT, D.W. **A Textbook of Histology**. Chapman & Hall, p.810-830, 1994.

CAPMANY, G., TAYLOR, A., BRAUDE, P. R., BOLTON, V. N. Cell cycle regulations: The timing of pronuclear formation, DNA synthesis and cleavage in the human 1-cell embryo. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v.2, n.5, p.299-306, 1996.

CARNEVALE, E. M., MACLELLAN, L. J., COUTINHO DA SILVA, M. A., SQUIRES, E. L. Pregnancies attained after collection and transfer of oocytes from ovaries of five euthanatized mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 1, p. 60-2, 36, 2003,

CARNEVALE, E. M., COUTINHO DA SILVA, M. A., PREIS, K. A., STOKES, J. E., SQUIRES, E. L. Establishment of pregnancies from oocytes collected from the ovaries of euthanized mares. **Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, Denver, Colorado, USA, 4-8 December, p. 531-533, 2004.

CARNEVALE, E.M., COUTINHO DA SILVA, M.A., PANZANI, D., STOKES, J.E, SQUIRES, E.L. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. **Theriogenology**, v.64, p.519-527, 2005.

CARNEVALE, E. M., MACLELLAN, L. J. Collection, evaluation, and use of oocytes in equine assisted reproduction. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v.22, n.3, p.843-856, 2006.

CARNEVALE, E. M., SESSIONS, D. R. In vitro production of equine embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, n.7, p.367-371, 2012.

CHEN, X., CHO, D.B., YANG, P.C. Double staining immunohistochemistry. **North American Journal of Medical Sciences**, v.2, n.5, p.241, 2010.

CHEESEMAN, I. M., DESAI, A. Molecular architecture of the kinetochoremicrotubule interface. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.33–46, 2008.

CHOI, Y.H., LOVE, L.B., VARNER, D.D., HINRICHS, K. Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v.66, p.955-963, 2006.

CHOI, Y. H., LOVE, L. B., VARNER, D. D., AND HINRICHS, K. Effect of holding technique and culture drop size in individual or group culture on blastocyst development after ICSI of equine oocytes with low meiotic competence. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.38–47, 2007.

CLAES, A., GALLI, C., COLLEONI, S., NECCHI, D., LAZZARI, G., DEELEN, C., BEITSMA, M., STOUT, T.A. Factors influencing oocyte recovery and in-vitro production of equine embryos in a commercial OPU/ICSI program. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.100, n.41, p.68-69, 2016.

CLAES, A., CUERVO-ARANGO, J., VAN DEN BROEK, J., GALLI, C., COLLEONI, S., LAZZARI, G., DEELEN, C., BEITSMA, M., STOUT, T. A. Factors affecting the likelihood of pregnancy and embryonic loss after transfer of cryopreserved in vitro produced equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v.51, n.4, p.446-450, 2019.

CUERVO-ARANGO, J., CLAES, A.N., STOUT, T.A. A retrospective comparison of the efficiency of different assisted reproductive techniques in the horse, emphasizing the impact of maternal age. **Theriogenology**, v.132, p.36-44, 2019a.

Cuervo-Arango, J., Claes, A.N., Stout, T.A. Mare and stallion effects on blastocyst production in a commercial equine ovum pick-up-intracytoplasmic sperm injection program. **Reproduction, Fertility and Development,** v. 31, n. 12, p. 1894-1903, 2019b.

DAI, Y., LEE, C., HUTCHINGS, A., SUN, Y., MOOR, R. Selective requirement for Cdc25C protein synthesis during meiotic progression in porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.62, p.519–532, 2000.

DELL'AQUILA, M.E., ALBRIZIO, M., MARITATO, F., MINOIA, P., HINRICHS, K. Meiotic competence of equine oocytes and pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as related to granulosa cell apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.68, n.6, p.2065-2072, 2003.

EWERS, H. Nano resolution optical imaging through localization microscopy. **Cellular Imaging Techniques for Neuroscience and Beyond**, p.81–100, 2012.

GALLI, C., COLLEONI, S., CLAES, A., BEITSMA, M., DEELEN, C., NECCHI, D., DUCHI, R., LAZZARI, G., STOUT, T.A. Overnight shipping of equine oocytes from remote locations to an ART laboratory enables access to the flexibility of ovum pick up-ICSI and embryo cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.100, n.41, p.82, 2016.

GALLI, C., COLLEONI, S., DUCHI, R., LAGUTINA, I., LAZZARI, G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v.98, n.1-2, p.39-55, 2007.

GALLI, C., DUCHI, R., COLLEONI, S., LAGUTINA, I., LAZZARI, G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. **Theriogenology**, v.81, p.138-15, 2014. HAWLEY, L.R., ENDERS, A.C., HINRICHS, K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, p. 243-252, 1995.

HINRICHS, K. Update on equine ICSI and cloning. **Theriogenology**, v.64, n.3, p.535-541, 2005.

HINRICHS, K., CHOI, Y.H., LOVE, L.B., VARNER, D.D., LOVE, C., WALCKENAER, B.E. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. **Biology of Reproduction**, v.72, p.1142–1150, 2005.

HINRICHS, K. Assisted reproduction techniques in the horse. **Reproduction**, **Fertility and Development**, v.25, p.80-93, 2012.

HINRICHS, K., CHOI, Y.H., NORRIS, J.D., LOVE, L.B., BEDFORD-GUAUS, S.J., HARTMAN, D.L., VELEZ, I.C. Evaluation of foal production following intracytoplasmic sperm injection and blastocyst culture of oocytes from ovaries collected immediately before euthanasia or after death of mares under field conditions. Journal of the American Veterinary Medical Association, v.241, n.8, p.1070-1074, 2012.

JACOBSON, C.C., CHOI, Y.H., HAYDEN, S.S., HINRICHS, K. Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v. 73, n. 8, p. 1116-1126, 2010.

JUNQUEIRA, L., CARNEIRO, J., **Histologia Básica**. 10^aed. 2004, Guanabara Koogan.

KARKI, M., KEYHANINEJAD, N., SHUSTER, C.B. Precocious centriole disengagement and centrosome fragmentation induced by mitotic delay. **Nature Communications**, v.8, n.15803, p.1-12, 2017.

KRIZAIC, I., WILLIAMS, S.J., SÁNCHEZ, P., RODRÍGUEZ-CORSINO, M., STUKENBERG, P. T., LOSADA, A. The distinct functions of CENP-C and CENP-

T/W in centromere propagation and function in *Xenopus* egg extracts. **Nucleus**, v.6, n.2, p.133–143, 2015.

LUNDIN, K., BERGH, C., HARDARSON, T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. **Human Reproduction**, v.16, n.12, p.2652-2657, 2001.

MACLELLAN, L.J., CARNEVALE, E.M., COUTINHO DA SILVA, M.A., SCOGGIN, C.F., BRUEMMER, J.E., AND SQUIRES, E.L. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. **Theriogenology**, v.58, p.911–919, 2002.

MITCHISON, T.J., SALMON, E.D. Mitosis: A history of division. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 1, p. E17-E21, 2001.

O'Connor, C. Cell Division: Stages of Mitosis. **Nature Education**, v.1, n.1, p.188, 2008.

RADER, K., CHOI, Y.H., HINRICHS, K. Intracytoplasmic sperm injection, embryo culture, and transfer of in vitro–produced blastocysts. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.32, p.401-413, 2016.

REICHMANN, J., NIJMEIJER, B., HOSSAIN, M. J., EGUREN, M., SCHNEIDER, I., POLITI, A. Z., ... ELLENBERG, J. Dual-spindle formation in zygotes keeps parental genomes apart in early mammalian embryos. **Science**, v.361, n.6398, p.189-193, 2018.

RIBEIRO, B.I., LOVE, L.B., CHOI, Y.H., HINRICHS, K. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.108, p.171–179, 2008.

RIZZO, M., DUCHEYNE, K. D., DEELEN, C., BEITSMA, M., CRISTARELLA, S., QUARTUCCIO, M., STOUT, T.A., DE RUIJTER-VILLANI, M. Advanced mare age impairs the ability of in vitro-matured oocytes to correctly align chromosomes on the metaphase plate. **Equine Veterinary Journal**, v.51, n.2, p.252-257, 2019.

RIZZO, M., DU PREEZ, N., DUCHEYNE, K.D., DEELEN, C., BEITSMA, M., STOUT, T.A.E., DE RUIJTER-VILLANI, M. The horse as a natural model to study

reproductive aging-induced aneuploidy and weakened centromeric cohesion in oocytes. **Aging**, v.12, n.21, p.22220, 2020.

SCHATTEN, G. Centrosome inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. **Developmental Biology**, v.165, p.299–335, 1994.

SHIN, M.R., PARK, S.W., SHIN, H., KIM, N.H. Nuclear and microtubule reorganization in nuclear-transferred bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, p.74–82, 2002.

SIMERLY, C., ZORAN, S.S., PAYNO, C., DOMINKO, T., SUTOVSKY, C., NAVARA, C.S., SALISBURY, J.L., SCHATTEN, G. Biparental inheritance of γtubulin during human fertilization: molecular reconstitution of functional zygotic centrosomes in inseminated human oocytes and in cell-free extracts nucleated by human sperm. **Molecular Biology of the Cell**, v.10, p.2955–2969, 1999.

STOUT, T.A.E. Clinical application of in vitro embryo production in the horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.89, p.103011, 2020.

TREMOLEDA, J.L., HAEFTEN, T., SOUT, T.A.E, COLENBRANDER, B., BEVERS, M.M. Cytoskeleton and Chromatin Reorganization in Horse Oocytes Following Intracytoplasmic Sperm Injection: Patterns Associated with Normal and Defective Fertilization. **Biology of Reproduction**, v.69, p.186–194, 2003.

TREMOLEDA, J. L., SCHOEVERS, E. J., STOUT, T. A. E., COLENBRANDER, B., BEVERS, M. M. Organization of the cytoskeleton during in vitro maturation of horse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.60, n.2, 260-269, 2001.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**, Raven Press, Nova Iorque, p.189-317.

HIPÓTESE

Zigotos equinos fertilizados por ICSI são propensos a má segregação cromossômica durante a primeira divisão mitótica, sendo uma importante causa de aneuploidia e perda embrionária.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram avaliar zigotos equinos 24 horas após a fertilização por ICSI e identificar as alterações mais frequentes durante a segregação cromossômica da primeira divisão mitótica.

"O impossível torna-se possível

Com a força de vontade."

Dalai Lama.



1	Artigo redigido segundo as normas da revista Biology of Reproduction, ISSN
2	0006-3363, ranqueada como A1 pelo QUALIS – CAPES quadriênio 2013 - 2016.
3	https://academic.oup.com/biolreprod
4	
5	
6	Chromosomal instability in equine ICSI embryos
7	
8	VFC Scheeren ^{1,2} , A Larreategui ² , M Beitsma ² , FO Papa ¹ , TAE Stout ² , M Ruijter-
9	Villani ²
10	¹ São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal
11	Science, Botucatu
12	² Utrecht University, Utrecht, Netherlands
13	

14 Abstract

The first mitotic division in the zygote is quite unique compared with mitotic 15 16 division in somatic cells. The oocyte loses its centrioles during oogenesis and at fertilization, the sperm cell re-introduces two centrioles into the oocyte. The 17 mechanisms driving these error-prone post-zygotic divisions are still poorly 18 understood. The objective of this study was to analyze the frequency and type of 19 chromosome segregation defects during the early mitotic divisions of equine ICSI 20 embryos. Systematic immunofluorescence and confocal microscopic was 21 performed in fixed equine zygotes 24 hours (n = 177 injected oocytes) after ICSI. 22 Forty nine zygotes were undergoing mitosis: 13 at pronuclear stage (26,5%), 11 23 at prophase or pro-metaphase (22,4%), 14 at metaphase (28,5%) and 11 at 24 anaphase or telophase (22,4%). The most common errors observed in the 25 zygotes undergoing mitosis were fragmented centrosomes and mispositioned 26 centrosomes. We conclude that the centrosome is not crucial for spindle 27

assembly. Also, we observed a high incidence of pericentrosomal material
fragmentation. This could explain why equine ICSI embryos still have low
efficiency in when compared to others animal species.

31 **Key-words:** zygote, centrosome, oocyte, aneuploidy, horse.

32

33 Introduction

Assisted reproduction technologies (ART) are widely used in human, being 34 livestock species and mouse important models to improve techniques. 35 Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is a technique first developed for infertile 36 couples, but it has been applied in many species, especially equine [1]. In the 37 horse, the use of ART has been severely limited by the difficulty to obtain success 38 in conventional in vitro fertilization (IVF), considering some issues involving the 39 40 zona hardening during maturation [2], failure of in vitro sperm capacitation [3] and embryo culture to the blastocyst stage [4]. 41

ICSI programs bring together several applications like for old donor mares, 42 mares with significant reproductive tract disorders, mares that need to be 43 euthanized or that die suddenly, bad quality semen due to reproductive disorders, 44 rare and/or expensive straws of frozen semen [5]. Another important point is that 45 in an OPU-ICSI commercial program 60% of blastocyst rate can be obtained, with 46 47 1.3-1.8 embryo per mare in a session [6,7]. When compared with conventional embryo transfer, recovery rate can reach 60-65%, when mares are inseminated 48 49 with fresh semen [8], but a lower rate ranging 30 to 50% when the insemination was done with chilled-transported and frozen-thawed semen [9]. 50

51 Despite most improvements in the various steps required to produce 52 embryos in vitro, obtaining blastocyst is still challenging. The first five days of 53 development are the most important period for a blastocyst formation. 54 Approximately 25% of the injected oocytes arrest their development at day 1 and another 25–30% are lost during the early stages of embryonic development in 55 vitro [10]. In human and horses, embryo aneuploidy is recognized as an important 56 57 contributor to developmental arrest and miscarriage [11, 12], this aneuploidy can arise at different stages of development but it is most prominent during the early 58 mitotic divisions of the embryo, remaining unclear the cellular origins of mitotic 59 aneuploidy [13]. 60

The first mitotic division in the zygote is guite unique compared with mitotic 61 division in somatic cells. The oocyte loses its centrioles during oogenesis and at 62 fertilization, the sperm cell re-introduces two centrioles into the oocyte [14]. 63 Sperm have two centrioles that are located in the neck, where the nucleus 64 65 attaches to the flagellum. One is closer to the nucleus and is referred to as the proximal centriole (PC) and the other one is at the base of the flagellum, referred 66 to as the distal centriole (DC) [15]. Both centrioles duplicate forming two pairs of 67 centrioles which are enveloped by pericentriolar material and thus generating two 68 centrosomes that act as the dominant centers of microtubule nucleation and 69 70 ensure formation of a single bipolar array early in mitosis [16].

However, a recent study has indicated how the spindle assembles in bovine zygotes, and was possible to realize that the presence of centrosomes had a little effect on spindle structure and dual spindles were observed [16], just like in rodent [17]. In equine zygotes, these mechanisms are not elucidated, and these differences probably play an important part in making the zygote susceptible to chromosome segregation errors. The mechanisms driving these error-prone post-zygotic divisions are still poorly understood. In order to improve the success rate of in vitro produced embryos, the aim of this study was to analyze the frequency and type of chromosome segregation defects during the early mitotic divisions of equine ICSI embryos.

82

83 Materials and methods

84 **Ethics statement**

All procedures involved in animal work were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments of the Animal Welfare Body Utrecht (Approval no: 5164-1-01).

88

89 **Oocyte collection and in vitro maturation**

Cumulus-oocyte complexes (COCs) were obtained by ovum pick-up 90 (OPU) from reproductive-age mares and from slaughterhouse derived ovaries. 91 OPU was performed by transvaginal ultrasound guided follicle aspiration. All 92 antral follicles larger than 5mm were punctured using a 12-G double-lumen 93 needle attached to a vacuum pump (CookMedical). After aspiration of the 94 follicular fluid, the follicle wall was scraped by rotating the needle, and the follicle 95 was flushed 8-10 times with 0.5-5mL (Cuervo-Arango et al., 2019) of OPU 96 recovery medium (EquiPlus, Minitube, Germany). 97

Ovaries from slaughtered mares were collected within 15 minutes of death and transported to the laboratory within 2 h at 21–25°C. COCs were obtained by scraping the follicle wall with a bone curette and flushing out the dislodged COCs [18] using OPU recovery medium (EquiPlus, Minitube, Germany). After both procedures, the collected fluid was poured through a sterile 70 mm filter and the contents of the filter were emptied into a sterile Petri dish. COCs were identified using a stereomicroscope at room temperature, they were washed seven times, transferred into a 2mL tube containing Hepes Synthetic Oviductal Fluid (H-SOF, Avantea, Cremona, Italy) and stored overnight at room temperature (~21°C).

For in vitro maturation, oocytes were washed and maintained for 24-26 h 108 at 38.5°C in 5% CO2-in-air in a 50:50 mixture of Dulbecco's modified eagle's 109 medium (DMEM) and Ham's F12 (GIBCO BRL Life Technologies, Bleiswijk, The 110 Netherlands) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma-Aldrich Chemical 111 Co., St. Louis, Missouri, United States), 0.125 µg/mL epidermal growth factor 112 (Peprotech Inc., Rocky Hill, New Jersey, United States), 0.1 IU/mL follicle-113 114 stimulating hormone, 0.6 mmol/L cysteine and 0.1 mmol/L cysteamine (Sigma-Aldrich Chemical Co.), 0.1% insulin, 0.1% transferrin and 0.1% sodium selenite 115 (VWR International BV, Amsterdam, The Netherlands). 116

117

118 Oocytes denudation, sperm preparation and ICSI

Mature MII oocytes were denuded from the surrounding cumulus cells by
gentle pipetting through a 155- and then 131-mm capillary plastic pipette (EZstrip; Origio) following exposure to 1 µg/mL solution of hyaluronidase (SigmaAldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, United States) in Hanks base medium
added 10% FCS at 38°C.

A 2mm piece of straw of frozen semen was cut, placed in a pre-warm microtube with 250µl G-MOPS (Vitrolife) added 10% FCS and incubated at 37°C for 30 minutes to swim-up. Then, 200µl of the top was took, placed on a new microtube and centrifuged for 2 minutes at 400xg. The pellet was resuspended
in 1000µl of G-MOPS 10% FCS. Semen was centrifuged again for 2 minutes at
400xg, and the pellet was mixed in the left 10-20µl, being ready to use. Just
before injection, 2 mL motile sperm suspension was mixed with 5 mL clinicalgrade polyvinyl pyrrolidone (PVP; 10%) in G-MOPS 10% FCS to slow sperm cell
movement and aid capture.

133 ICSI was performed using an inverted microscope (Olympus IX71) 134 equipped with a micromanipulator (Transfer Man NK2; Eppendorf). Only one 135 motile spermatozoa with apparently normal morphology were chosen, 136 immobilised by swiping the injection needle (MIC-50-Angled 308; Origio) across 137 its tail and against the bottom of the dish. The spermatozoon was then aspirated 138 tail-first into the needle and injected into the ooplasm with a minimum volume of 139 accompanying medium.

The oocyte was held stationary by suction via the holding pipette (MPH-LG-Angled 308; Origio) with the polar body positioned at 12 o'clock and the injection needle advanced through the zona pellucida and plasma membrane at the 3 o'clock position for the sperm injection.

Subsequently ICSI, injected oocytes were cultured in 15µL microdroplets
of a commercial human embryo culture medium (Global Medium; LifeGlobal) with
10% FCS under mineral oil (Ovoil, Vitrolife) in a humidified atmosphere containing
5% CO2 and 5% O2 at 38.58C.

148

149 Zygotes fixation and immunostaining

After 24 hours of culture the zygotes were fixed. A pre-permeabilization was performed using a solution of 0,25% Triton X-100 in ultrapure water for 5 seconds and the zygotes were incubated for 30 min in a Ca²⁺ buffer solution (94 mM Pipes, pH 7.0, 0.94 mM MgCl2, 94 μ M CaCl2, 0.1% Triton X-100, and 1% PFA) . Following, they were washed 4 times in a 0,1% Triton X-100 solution in phosphate-buffered saline (PBST 0,1%) for 5 min and storage in a microtube at 4°C in the same solution.

All the following treatments were done within wells of ibidi μ-Slides (81501,
 μ-Slide Angiogenesis; ibidi) filled with 40 μl of solution per well.

159

160 Experiment 1

Zygotes were washed 2 times for 5 min in PBST 0,1% added 3% of bovine 161 serum albumin (BSA 3%) and incubated for 1 hour with PBST 0,1% + BSA 3% 162 added 5% of normal goat serum (NGS 5%) at room temperature. After, an 163 164 overnight incubation was done with 1:100 anti- α tubulin antibody made in chicken (Ab89984 Abcam) and 1:200 anti-NEDD1 antibody made in mouse (H00121141 165 Abnova) in PBST 0,1% + BSA 3% + NGS 5% at 4°C in humidified chamber. 166 Following next day, zygotes were washed 3 times for 10 min in PBST 0,1% + 167 BSA 3% and incubated with 1:250 Goat Anti-Chicken Alexa Fluor 647 antibody 168 (A21449 Mol Probes), 1:250 Goat anti Mouse Alexa Fluor® 488 antibody (169 A11029 Invitrogen) and 1:250 DAPI in PBST 0,1% + BSA 3% + NGS 5%, for 3 170 hours at room temperature in a dark chamber. Zygotes were washed 2 times for 171 5 min in PBST 0,1% + BSA 3% and 2 times for 5 min in PBS, then mounted on 172 glass slides with anti-fade mounting medium (Vectashield, Vector Laboratories) 173 using 0.12-mm spacer wells (Secure-Seal Spacer; Thermofisher Scientific) and 174 175 sealed under a coverslip using nail polish.

176

177 Experiment 2

Zygotes were washed 2 times for 5 min in PBST 0,1% added 3% of bovine 178 serum albumin (BSA 3%) and incubated for 1 hour with PBST 0,1% + BSA 3% 179 added 5% of normal goat serum (NGS 5%) at room temperature. After, an 180 181 overnight incubation was done with 1:100 anti- α tubulin antibody made in chicken (Ab89984 Abcam), 1:200 anti-NEDD1 antibody made in mouse (H00121141 182 Abnova) and 1:250 Acetylated α tubulin K40 made in rabbit (ABS676-0100) in 183 PBST 0,1% + BSA 3% + NGS 5% at 4°C in humidified chamber. Following next 184 day, zygotes were washed 3 times for 10 min in PBST 0,1% + BSA 3% and 185 incubated with 1:250 Goat Anti-Chicken Alexa Fluor 647 antibody (A21449 Mol 186 Probes), 1:250 Goat anti Mouse Alexa Fluor® 488 antibody (A11029 Invitrogen), 187 1:250 Goat anti Rabbit Alexa Fluor 568 antibody (A11036) and 1:250 DAPI in 188 189 PBST 0,1% + BSA 3% + NGS 5%, for 3 hours at room temperature in a dark chamber. Zygotes were washed 2 times for 5 min in PBST 0,1% + BSA 3% and 190 2 times for 5 min in PBS, then mounted on glass slides with anti-fade mounting 191 medium (Vectashield, Vector Laboratories) using 0.12-mm spacer wells (Secure-192 Seal Spacer; Thermofisher Scientific) and sealed under a coverslip using nail 193 polish. 194

195

196 Image acquisition, analyses and statistics

Image acquisition was performed using a Leica TCS-SP5 confocal laser scanning microscope equipped with a 63x objective in Experiment 1. DAPI was stimulated with a 408-nm laser, and emission was detected between 414 and 466 nm (blue channel), Alexa Fluor 488 was separately stimulated with a 488-nm laser, and emission was detected in the 511–577 nm range (magenta channel), Alexa Fluor 647 was stimulated with a 647-nm laser, and emission was detected
in the 511–577 nm range (green channel). The microtubular spindle, labelled with
Alexa Fluor 647, the chromosomes, labelled with DAPI, and the centrosomes
labelled with Alexa Fluor 488 were identified using sequential confocal sections
(Z-stacks) at 0.17-µm intervals.

Image acquisition was performed using a Olympus IX83 P2ZF confocal 207 laser scanning microscope equipped with an objective lens UPLAPO OHR 208 60x/1,5 in Experiment 2. DAPI was stimulated with a 405-nm laser, and emission 209 was detected between 453-455 nm (blue channel), Alexa Fluor 488 was 210 separately stimulated with a 488-nm laser, and emission was detected in the 495-211 519 nm range (magenta channel), Alexa Fluor 568 was stimulated with a 561-nm 212 laser, and emission was detected in the 578-603 nm range (gray channel), Alexa 213 214 Fluor 647 was stimulated with a 640-nm laser, and emission was detected in the 625-670 nm range (green channel). The microtubular spindle, labelled with Alexa 215 Fluor 647, the chromosomes, labelled with DAPI, the acetylated tubulin, labeled 216 with Alexa Fluor 568, and the centrosomes labelled with Alexa Fluor 488 were 217 identified using sequential confocal sections (Z-stacks) at 0.27-µm intervals. 218

A three-dimensional (3D) image of the spindle, chromosomes and centrosomes was then created and analysed using Imaris 8.2 software. The Imaris surface tool was used to render solid surfaces best representing both the spindle and the centrosomes. To create a 3D image of the meiotic spindle, the green channel was selected, a Gaussian smoothing filter was applied (detail level of 0.0854 μ m). To create a 3D image of the centrosomes, the magenta channel was selected, a Gaussian smoothing filter was applied (detail level of 0.0853 μ m). Three-dimensional measurements of the spindle (pole-to-pole length, width and volume) were taken from the ellipsoid statistics and centrosomes measurements (number of surface, distance, volume) were taken fro.m 3D view of Imaris 8.1 (Bitplane).

Descriptive statistics was performed, considering number of oocytes,
 zygotes and respective errors to obtain percentage of data. Graphics were made
 using GraphPad Prism.

233

234 Results

In total, 326 COCs were recovered, being 237 from OPU procedures (n= 235 7 mares, 6-16y old) and 89 from slaughtered mares (n= 7 mares, 14-18y old). 236 Total maturation rate was 54,3%, considering 177 injected oocytes (177/326), 237 57,4% for OPU derived oocytes (136/237) and 46,1% for slaughter derived 238 oocytes (41/89). Among the fixed zygotes, 49 were undergoing mitosis: 13 at 239 pronuclear stage (26,5%), 11 at prophase or pro-metaphase (22,4%), 14 at 240 metaphase (28,5%) and 11 at anaphase or telophase (22,4%) (Figure 1 A,B). 241 Some zygotes (n=33) were excluded due to the failure on fertilization or staining 242 procedures or were already in 2 cell stage (n=54). The most common errors 243 observed in the zygotes undergoing mitosis were fragmented centrosomes and 244 245 abnormally positioned centrosomes.





Figure 1: First mitotic division in an equine zygote. A: zygotes during different stages of first mitosis: early prophase, prophase, metaphase, anaphase, telophase and 2 cells stage. B: number of zygotes on first mitosis, 2 cells stage or excluded. C: spindle volume among zygotes during metaphase (n=10 zygotes).

Two spindles could be distinguished in 56% (n = 14/25; Figure 2) of the zygotes during prophase / pro-metaphase / metaphase, where the majority of them were proximal to each other (Figure 2 A,C) and synchronous (Figure 2 B,D).



Figure 2: Dual and asynchronous spindles characteristics in equine zygotes. A: Dual distal spindles. B: Dual asynchronous spindles. C: Number of zygotes with dual proximal or distal spindles. D: Number of zygotes with dual synchronous or asynchronous spindles.

261

Regarding the centrosomes, 64,2% (n = 9 / 14; Figure 3 A,B) of zygotes in metaphase had multiple fragments of pericentrosomal material, sometimes located in the spindle poles or close to it. Also, the volume of the pericentrosomal material from each spindle pole varied among zygotes (Figure 3C).



Figure 3: Multiple pericentriolar material (PCM) in the spindle poles of equine zygotes. A: Multiple PCM in the different stages of the first mitosis. B: Number of zygotes presenting multiple peri-centrosomes, bicentrosomes and monocentrosome. C: volume of pericentrosomal material in each spindle pole (blue means one pole/ pink means the other pole, µm3).

272

In order to investigate the behavior and precise location of centrioles through NEDD1 staining, the acetylated tubulin marker was used, being possible to observe the sperm tail inside the zygote (n= 19 / 102 zygotes) (Figure 4).



Figure 4: First mitotic division in an equine zygote with acetylated tubulin marker, correlating the position of sperm tail and pericentriolar material during metaphase.

280

281 Discussion

In order to investigate the frequency and type of chromosome segregation defects during the first cell division in equine zygotes, we analyzed early mitosis of equine ICSI embryos. First, we performed 3D confocal microscopy of zygotes fixed at 24 hours after fertilization, and we could observe different stages of the first embryonic mitosis using the immunofluorescence for pericentrosomal material, microtubules, and DNA. Many studies related to assisted reproductive technologies in mares have been developed, specially focused on the impact of age on oocyte quality and reproductive success [18-20]. To the best of our knowledge, this is the first study that evaluated the first mitotic division in equine zygotes 24 hours after fertilization, observing the spindle assembly and chromosome segregation.

because 293 Equine zygotes are difficult to obtain, particularly slaughterhouses are no allowed in many countries, and also the number of 294 slaughtered and research mares for OPU and scraping, respectively, are not that 295 big. The procedures of in vitro manipulation of oocytes require many steps, and 296 these cells are specially sensitive to manipulation. In vitro maturation is a delicate 297 process for the oocyte, and we obtained 54,3% of maturation rate, which can 298 range from 40 to 70% among laboratories [1,18]. 299

After sperm injection, we obtained 42% of fertilization rate, which ranges from 44 to 77% [1], and this is another issue that explain why researching with equine zygotes is so challenging. The use of confocal microscopy provides a potentially efficient method to analyze the limited numbers of samples [20].

In this study, we could observe that during fertilization of equine oocytes, microtubule organization is initiated by the sperm midpiece (Figure 4), which, via a distinct nucleation site, orchestrates formation of the sperm aster. Thus, the zygotic centrosome in horses is primarily paternally inherited, and combined with pericentrosomal material recruited from the oocyte, just as it is in other species [21-23].

The presence of two spindles (Figure 2) has been described in other species, like cow [16] and mouse [17]. In equine, just like in cow, they inherit the centrioles from the sperm [15,24], so they have two centers of cytoplasmic microtubule nucleation, and the formation of a single bipolar array early in mitosis is expected. However, in horse was not clear whether these centrioles are in fact fully functional and how spindle assembly proceeds. During this study, we could observe a high frequency of dual spindle assembly, like in the cow [16] and mouse [17], as well as centrosome misplacement, which indicates that centrosome does not play an important role for chromosome segregation.

The centrosome fragmentation and precocious disengagement of 319 centrioles, mainly in the metaphase, were the most common error observed 320 (Figure 3). In bovine zygotes, the same pattern has also been observed 321 (Larreategui-Aparício, personal communication). The mechanisms driving 322 centriole disengagement have been studied, and is thought that enzymes, like 323 separase, are involved in the breakdown of separase, that keeps the centrioles 324 325 together in the spindle poles [25]. So, this precocious disengagement can cause an abnormal separation of chromosomes, leading to an aneuploidy embryo. 326

327

328 Conclusion

We conclude that the centrosome is usually mispositioned during the first mitotic division in equine zygotes, which seems to does not play a crucial role for spindle assembly. Also, we observed a high incidence of pericentrosomal material fragmentation. This could explain why equine ICSI embryos still have low efficiency, specially caused by missegregation of chromosomes, leading to aneuploidy embryos. Further studies need to be developed in order to clarify the role of centrosomes in the first mitosis of equine ICSI embryos.

336

337

338 Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 88882.433332/2019-01 and 88887.467895/2019-00.

342

343 **References**

[1] Lazzari G, Colleoni S, Crotti G, Turini P, Fiorini G, Barandalla M, Landriscina
L, Dolci G, Benedette M, Duchi R, Galli C. Laboratory production of equine
embryos. *J Eq Vet Sci* 2020:89:1-9.

[2] Hinrichs K, Love CC, Brinsko SP, Choi YH, Varner DD. In vitro fertilization of
in vitro-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of
maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates
of fertilization in vivo after oviductal transfer. Biol Reprod 2002;67:256-62.

[3] Maitan P, Bromfield EG, Stout TA, Gadella BM, Leemans B. A stallion
spermatozoon's journey through the mare's genital tract: In vivo and in vitro
aspects of sperm capacitation. *Ani Reprod Sci* 2021:106848.

[4] Tremoleda JL, Stout TA, Lagutina I, Lazzari G, Bevers MM, Colenbrander B,
Galli C. Effects of in vitro production on horse embryo morphology, cytoskeletal
characteristics, and blastocyst capsule formation. *Biol Reprod*2003;69:1895E906.

[5] Stout TAE. Clinical application of in vitro embryo production in the horse. *J Equi Vet Sci* 2020;89:103011.

[6] Jacobson CC, Choi YH, Hayden SS, Hinrichs K. Recovery of mare oocytes
 on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after
 intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2010;73(8):1116-1126.

[7] Claes A, Galli C, Colleoni S, Necchi D, Lazzari G, Deelen C, Beitsma M, Stout

364 T. Factors influencing oocyte recovery and in-vitro production of equine embryos

in a commercial OPU/ICSI program. *J Equi Vet Sci* 2016;100(41):68-69.

[8] Marinone AI, Losinno L, Fumuso E, Rodríguez EM, Redolatti C, Cantatore S,
Cuervo-Arango, J. The effect of mare's age on multiple ovulation rate, embryo
recovery, post-transfer pregnancy rate, and interovulatory interval in a
commercial embryo transfer program in Argentina. *Ani Reprod Sci* 2015;158:5359.

[9] Stout TAE. Equine embryo transfer: review of developing potential. *Equi Vet*J 2006;38(5):467-478.

[10] Amargant F, García D, Barragán M, Vassena R, Vernos I. Functional
analysis of human pathological semen samples in an oocyte cytoplasmic ex vivo
system. *Sci Rep* 2018;8(1):1-10.

[11] Maxwell SM, Colls P, Hodes-Wertz B, McCulloh DH, McCaffrey C, Wells D,
Munne S, Grifo JA. Why do euploid embryos miscarry? A case-control study
comparing the rate of aneuploidy within presumed euploid embryos that resulted
in miscarriage or live birth using next-generation sequencing. *Fertil Steril*2016;106:1414–1419.e5.

[12] Shilton CA, Kahler A, Davis BW, Crabtree JR, Crowhurst J, McGladdery AJ,
Wathes DCI, Raudsepp T, de Mestre AM. Whole genome analysis reveals

aneuploidies in early pregnancy loss in the horse. *Sci Rep Nat Res*2020;10:13314.

[13] Cavazza T, Takeda Y, Politi AZ, Aushev M, Aldag P, Baker C, Choudhary M,
Bucevicius J, Lukinavicius G, Elder K, Blayney M, Hahn AL, Niemann H, Herbert
M, Schuh M. Parental genome unification is highly error-prone in mammalian
embryos. *Cell* 2021;184:2860–2877.

[14] Fishman EL, Jo K, Nguyen QPH, Kong D, Royfman R, Cekic AR, Khanal s,
Miller AL, Simerly C, Schatten G, Loncarek J, Mennella V, Avidor-Reiss T. A
novel atypical sperm centriole is functional during human fertilization. *Nat Commun* 2018;9:2210.

[15] Leung MR, Roelofs MC, Ravi RT, Maitan P, Henning H, Zhang M, Bromfield
EG, Howes SC, Gadella BM, Bloomfield-Gadêlha H, Zeev-Ben-Mordehai T. The
multi-scale architecture of mammalian sperm flagella and implications for ciliary
motility. *EMBO J* 2021;40(7):e107410.

[16] Schneider I, de Ruijter-Villani M, Hossain MJ, Stout TAE, Ellenberg J. Dual
spindles assemble in bovine zygotes despite the presence of paternal
centrosomes. *J Cell Biol* 2021;220(11):e202010106.

[17] Reichmann J, Eguren M, Lin Y, Schneider I, Ellenberg J. Live imaging of cell
division in preimplantation mouse embryos using inverted light-sheet microscopy. *Method Cell Biol* 2018;145:279-292.

[18] Rizzo M, Ducheyne KD, Deelen C, Beitsma M, Cristarella S, Quartuccio M,
Stout TAE, de Ruijter-Villani M. Advanced mare age impairs the ability of in vitro-

405 matured oocytes to correctly align chromosomes on the metaphase plate. *Equine*406 *Vet J* 2019;51(2):252–257.

[19] Rizzo M, du Preez N, Ducheyne KD, Deelen C, Beitsma MM, Stout TAE, de
Ruijter-Villani M. The horse as a natural model to study reproductive aginginduced aneuploidy and weakened centromeric cohesion in oocytes. *Aging*2020;12(21):22220-22232.

[20] Ruggeri E, DeLuca KF, Galli C, Lazzari G, DeLuca JG, Stokes JE, Carnevale
EM. Use of confocal microscopy to evaluate equine zygote development after
sperm injection of oocytes matured in vivo or in vitro. *Mic Mic* 2017;23(6):11971206.

[21] Navara CS, First NL, Schatten G. Microtubule organization in the cow during
fertilization, polyspermy, parthenogenesis, and nuclear transfer: the role of the
sperm aster. *Dev Biol* 1994;162:29–40.

[22] Simerly C, Wu G, Zoran S, Ord T, Rawlins R, Jones J, Navara C, Gerrity M,
Rinehart J, Binor Z, Asch R, Schatten G. The paternal inheritance of the
centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the
implications for infertility. *Nat Med* 1995;1:47–53.

[23] Kim NH, Simerly C, Funahashi H, Schatten G, Day BN. Microtubule
organization in porcine oocytes during fertilization and parthenogenesis. *Biol Reprod* 1996;54:1397–1404.

[24] Amargant F, Pujol A, Ferrer-Vaquer A, Durban M, Martínez M, Vassena R,
Vernos I. The human sperm basal body is a complex centrosome important for
embryo pre-implantation development. *Mol Hum Reprod* 2021;27(11):gaab062.

[25] Karki M, Keyhaninejad N, Shuster CB. Precocious centriole disengagement
and centrosome fragmentation induced by mitotic delay. *Nat Commun*2017;8(1):1-12.