



Produção *in vitro* de embriões equinos: o que pode dar errado neste processo?

In Vitro Production of Equine Embryos: What Can Go Wrong in This Process?

**Verônica Flores da Cunha Scheeren^{1*}, Luísa Fontes Giachini¹, Mariana Zanini Tortato¹,
Aimé de Medeiros Friso¹**

¹Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brasil

Resumo

Ao longo dos anos, um grande avanço é observado no desenvolvimento de tecnologias de reprodutivas (ART), principalmente na produção *in vitro* (PIV) de embriões equinos, com resultados satisfatórios nas taxas de recuperação oocitária, maturação de oócitos e cultivo embrionário. A técnica mais consolidada é a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que reúne diversas aplicações, como para éguas doadoras idosas, fêmeas 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. Mais recentemente, resultados animadores foram obtidos com a produção de embriões pela técnica convencional de fertilização (FIV). Todavia, a eficiência da PIV ainda apresenta resultados oscilantes, devido a inúmeros fatores, como baixa taxa de clivagem e erros na segregação cromossômica durante a primeira divisão mitótica no zigoto equino. Tais falhas resultam em blastocistos com organização celular deficiente, especialmente em embriões de desenvolvimento lento, comprometendo a viabilidade embrionária e levando à baixa eficiência, quando comparados a outras espécies animais. O objetivo desta revisão é abordar sobre a produção *in vitro* de embriões equinos e as dificuldades encontradas neste processo, que podem levar a falhas embrionárias e redução nas taxas de fertilidade.

Palavras-chave: égua, garanhão, ICSI, FIV, zigoto.

Abstract

Over the years, significant progress has been made in the development of assisted reproductive technologies (ART), especially in the in vitro production (IVP) of equine embryos, with satisfactory outcomes in oocyte recovery, maturation, and embryo culture. The most established technique is intracytoplasmic sperm injection (ICSI), which has multiple applications, such as for aged donor mares, females that need to be euthanized or die suddenly, animals with reproductive tract disorders, poor-quality semen, and rare and/or expensive frozen semen straws. More recently, promising results have been obtained using conventional in vitro fertilization (IVF). However, the efficiency of IVP remains inconsistent due to numerous factors, including low cleavage rates and chromosome segregation errors during the first mitotic division in equine zygotes. These failures result in blastocysts with poor cellular organization, especially in slow-developing embryos, compromising embryo viability and leading to lower efficiency when compared to other animal species. The aim of this review is to discuss the in vitro production of equine embryos and the challenges associated with the process, which may lead to embryonic failure and reduced fertility rates.

Keywords: mare, stallion, ICSI, IVF, zygote.

Introdução

O desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida em equinos vem crescendo exponencialmente em todo o mundo, cujas técnicas de inseminação artificial e transferência de embriões produzidos *in vivo* ocupam lugar de destaque. Todavia, técnicas de produção *in vitro* (PIV) de embriões, 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).

Ao longo dos anos, a fertilização, de modo convencional, apresentou resultados muito oscilantes, que apesar de numerosas tentativas para se estabelecer protocolos eficazes para FIV, a eficiência era baixa (Leemans et al., 2016). Em 2022, Felix e colaboradores relataram um grande avanço, descrevendo o desenvolvimento de um protocolo de sucesso para capacitação espermática e fertilização *in vitro* de oócitos equinos, onde foi possível a produção de blastocistos e potros nascidos a partir da técnica.

Todavia, o protocolo ainda apresenta algumas limitações, principalmente às inerentes ao sêmen, pois os resultados obtidos são com sêmen fresco diluído (Felix et al., 2022). Como muitas vezes a demanda da PIV é devido à escassez de sêmen, como por morte do garanhão, o material genético encontra-se criopreservado, então a ICSI torna-se a melhor alternativa, pois é possível fertilizar oócitos equinos *in vitro* com resultados razoáveis (Stout, 2020).

Para aplicação desta biotecnologia, o método mais empregado para obtenção de oócitos é através da aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal (OPU) (Galli et al., 2007). A partir deste procedimento é possível aspirar folículos imaturos e/ou pré-ovulatórios, podendo ser realizada ao longo de todo o ano, devolvendo o potencial reprodutivo de éguas subfêrteis ou infêrteis. Ainda, pode-se recuperar oócitos de ovários excisados de éguas *post mortem*, como uma última alternativa de armazenamento de material genético (Carnevale et al., 2005; Cuervo-Arango et al., 2019a).

A injeção intracitoplasmática de espermatozoide (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 – 1,5 blastocisto por procedimento (Cuervo-Arango et al., 2019a), cujas causas de parada no desenvolvimento embrionário precoce durante a progressão do zigoto após ICSI ainda não estão completamente 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 acontece em outras espécies (Lundin et al. 2001). 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 centrosomos. Todas essas diferenças provavelmente desempenham um papel importante em tornar o zigoto suscetível a erros de segregação cromossômica (Reichmann et al., 2018).

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. Sabe-se que anexações anormais dos cromossomos e segregação cromossômica aberrante são frequentes durante este processo, contribuindo para erros mitóticos e produzindo embriões aneuploides, que não continuarão em seu desenvolvimento (Scheeren et al., 2023).

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.

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 quimiotático para orientar os espermatozoides em direção ao oócito (Bloom, 1994).

A entrada do espermatozoide no oócito, cujo material genético se encontra parado em metafase 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 união 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).

Primeira divisão mitótica

A primeira divisão mitótica do zigoto apresenta características bastante distintas em relação à mitose das células somáticas. Em vez de um único núcleo, o zigoto possui dois pronúcleos; além disso, seu citoplasma é significativamente maior do que o das células somáticas. O processo de nucleação dos microtúbulos também difere, sendo impulsionado pelos centríolos paternos em conjunto com o material pericentriolar de origem materna, o que resulta na formação de dois centrossomos. Essas particularidades provavelmente contribuem para a maior vulnerabilidade do zigoto a erros na segregação dos cromossomos (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 (Fig. 1).

A mitose começa com a prófase, durante a qual os cromossomos começam a sofrer um processo de condensação que continuará até a metáfase (Fig. 2). 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).

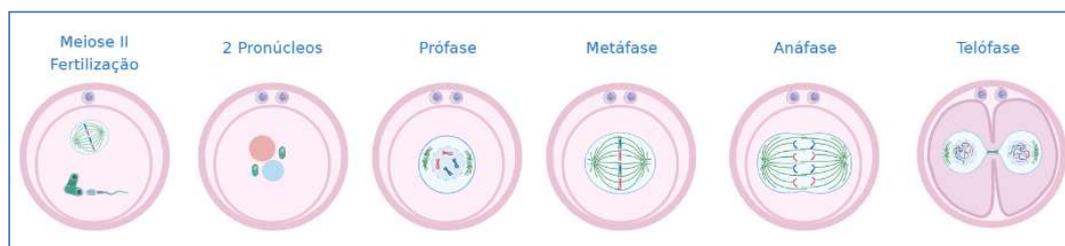


Figura 1. Primeira divisão mitótica de um embrião equino. Os eventos da mitose se iniciam após a fusão do material genético dos gametas, dando origem a uma célula diploide (2n). Fonte: arquivo pessoal.

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 cinetocoros nas cromátides irmãs estão conectados por microtúbulos aos polos opostos do fuso (Cheeseman, Desai, 2008).

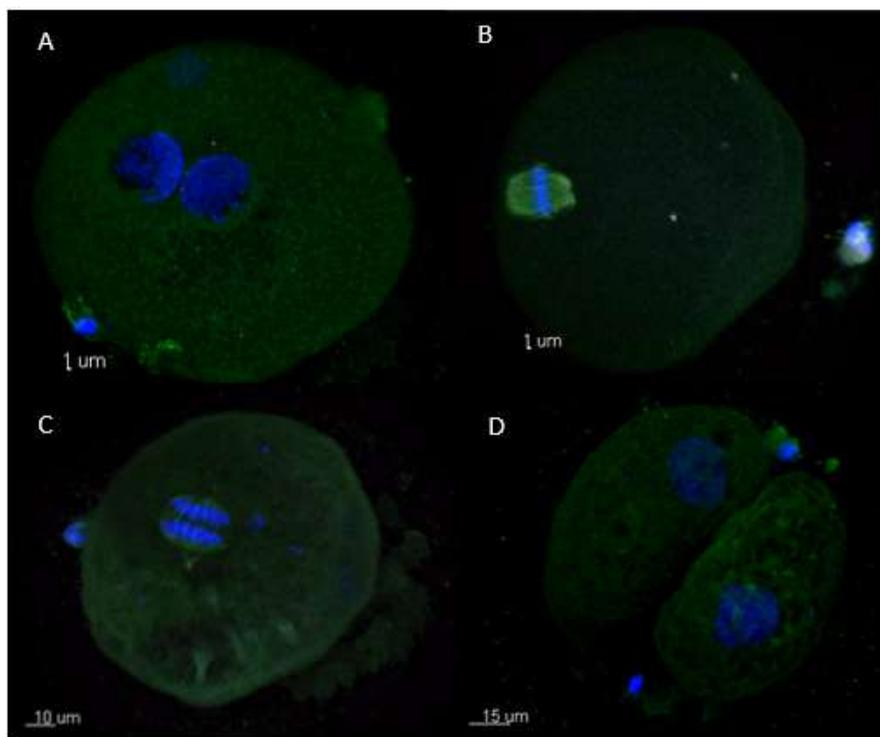


Figura 2. Zigotos equinos imunocorados e avaliados por microscopia confocal em diferentes estágios da primeira divisão mitótica. A: fase de pronúcleos. B: metáfase. C: anáfase. D: duas células. Fonte: arquivo pessoal.

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 cinetocóricos 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 separase (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. Produção de embriões *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 apresenta limitações, apesar de resultados promissores (Felix et al., 2022). Como alternativa para a fertilização de oócitos *in vitro*, é possível a utilização da técnica de ICSI (Hinrichs et al., 2005), que traz resultados satisfatórios.

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% dos folículos aspirados resultam em oócitos recuperados, 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 considerável redução 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 (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 (*ovum pick up*, 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 fêmeas que foram sacrificadas 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; recuperação de oócito em maturação do folículo pré-ovulatório, após a administração de hCG ou um análogo de GnRH. Ambas as técnicas podem ser 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 oocitária eram muito baixas, girando em torno de $\leq 25\%$ (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 pré-ovulatórios, 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 ± 35 mm, 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., 2008). Todavia, em casos de atraso ainda pode ser possível obter sucesso (Carnevale et al., 2003). Os ovários devem ser armazenados 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., 2014). 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 desencadarmos 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 morfológicamente 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., 2014). Entre os dias 5 e 7 após ICSI, naqueles embriões que se desenvolvem normalmente será observada a formação da blastocèle (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., 2014). 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. Fertilização *in vitro* (FIV)

A fertilização *in vitro* convencional, baseada na co-incubação de gametas, consiste na penetração de um oócito maduro por um espermatozoide capacitado, sendo uma técnica amplamente utilizada em diversas espécies, como humanos (Steptoe, Edwards, 1978), bovinos e suínos (Perry, 2013). Em equinos, apesar do nascimento de dois potros produzidos por essa técnica em 1991 (Palmer et al., 1991; Bezard et al., 1992), muitos anos se passaram até o estabelecimento de um protocolo confiável e replicável para fertilização *in vitro* (Felix et al., 2022).

Entre os fatores limitantes apontam-se a capacitação espermática (Alm et al., 2001; Hinrichs et al., 2002), a maturação do oócito (Li et al., 2001) e alterações na zona pelúcida (Dell'Aquila et al., 1996). As tentativas de estabelecer protocolos mais eficientes de FIV equina não tiveram sucesso, mesmo com o uso de tratamentos espermáticos eficazes em outras espécies, como heparina (Roasa et al., 2007), cafeína (Blue et al., 1989), combinações de penicilamina, taurina, hipotaurina e epinefrina (Dell'Aquila et al., 1996; Alm et al., 2001), e ionóforo de cálcio A23187 (Blue et al., 1989; Dell'Aquila et al., 1996; Alm et al., 2001; Hinrichs et al., 2002).

A falta de informações sobre a capacitação espermática de garanhões consiste num entrave para a elaboração de metodologias que mimetizem a interação dos gametas masculinos com o epitélio da tuba uterina (Leemans et al, 2016), sendo o tempo necessário para a capacitação dos espermatozoides *in vivo* ainda desconhecido. Infelizmente, a avaliação, ao longo do tempo, das mudanças fisiológicas nos espermatozoides em cultivo é problemática, já que a motilidade diminui rapidamente (Bedford et al., 1999).

Recentemente, Felix e colaboradores (2022) avaliaram a capacidade fertilizante de espermatozoides equinos incubados por um período prolongado de 22h, em meio contendo epinefrina (PHE), e obtiveram resultados promissores com 47-79% de fertilização com 1 hora de co-incubação. Ainda, puderam concluir que foi crucial a diluição do sêmen fresco após a colheita e que uma pré-incubação menor que 6 horas não foi suficiente para capacitação espermática e fertilização. Sugere-se que este é um processo lento (6-22h), mas que a presença de PHE no meio foi crucial para manutenção da motilidade espermática ao longo deste processo.

Quantos aos resultados de fertilidade, obtiveram >50% de fertilização e taxa de blastocistos de 54%, mostrando dados concisos e replicáveis, o que era um grande desafio em trabalhos anteriores (Alm et al., 2001; Felix et al., 2022). Três embriões de FIV foram transferidos para éguas receptoras, o que resultou no nascimento de três potros saudáveis (Felix et al., 2022).

Apesar do grande impacto deste trabalho, podendo ser referenciado como um grande marco histórico para as tecnologias de reprodução assistida (ART), o sucesso da técnica deu-se com a utilização de sêmen fresco (Feliz et al., 2022). Tratando-se de problemas inerentes à fertilidade da égua, a FIV comercial será uma importante ferramenta. Todavia, em casos onde o sêmen é escasso, principalmente devido à morte do garanhão, esse material genético encontra-se criopreservado, e a ICSI torna-se, ainda, a única alternativa para a produção de embriões *in vitro* (Stout, 2020).

Segunda a Dr. Katrin Hinrichs (comunicação pessoal), estudos na FIV com sêmen congelado já vêm sendo desenvolvidos, mas ainda apresentam resultados bastante inferiores ao sêmen fresco, e com grande diferença de fertilidade entre diluidores comerciais. Até o momento, as melhores taxas de blastocisto obtidas foram com diluente de congelação desenvolvido por seu grupo de pesquisadores, a nível de pesquisa.

7. Fertilidade, erros durante a primeira divisão mitótica e desenvolvimento embrionário

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 60º 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 influenciada 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 subfêteis (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 equinos, 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), acreditando-se que a aneuploidia surja durante as divisões mitóticas do embrião, no entanto, as origens celulares da aneuploidia mitótica permanecem desconhecidas (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.

Ruggeri et al. (2017) avaliaram os eventos após a fertilização por ICSI de oócitos maturados *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.

Em um estudo recente (Scheeren et al., 2023), o objetivo foi investigar a frequência e os tipos de defeitos na segregação cromossômica durante a primeira mitose de zigotos equinos obtidos por ICSI. Foram analisados 326 complexos cúmulo-oócito (COCs), com taxa de maturação de 54,3% e taxa de fertilização de 42%. Os zigotos fixados, 24 horas após a injeção, foram avaliados por microscopia confocal 3D, utilizando marcações para DNA, microtúbulos e material pericentrossômico.

Dos zigotos em mitose (n=49), 56% apresentaram fusos mitóticos duplos, e 64,2% que estavam em metáfase mostraram fragmentação do material pericentrossômico, que é de origem oocitária, enquanto que o centrossomo é herdado do pai, assim como em outras espécies (Navara et al., 1994; Simerly et al., 1995; Kim et al., 1996). Esses achados indicam que a montagem do fuso mitótico em equinos é frequentemente anormal, contribuindo para erros de segregação cromossômica e possível aneuploidia (Scheeren et al., 2023; Stout et al., 2024), o que pode estar relacionado à baixa eficiência embrionária em embriões equinos produzidos por ICSI.

Em estágios de desenvolvimento embrionário mais avançados, também foi possível observar algumas alterações na diferenciação e organização das linhagens celulares de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. O estudo de Umair e colaboradores (2023) comparou blastocistos equinos produzidos *in vitro* com aqueles desenvolvidos *in vivo*, analisando a expressão de marcadores específicos de linhagem celular (CDX-2 para trofotoderma, SOX-2 para epiblasto e GATA-6 para endoderma primitivo). Nos embriões *in vivo*, observou-se uma clara segregação das linhagens celulares: o marcador CDX-2 foi restrito ao trofotoderma, SOX-2 ao epiblasto e GATA-6 ao endoderma primitivo, com uma organização celular compacta e bem definida. Em contraste, os embriões *in vitro* apresentaram uma massa celular interna mal compactada, com células epiblasticas (SOX-2 positivas) e de endoderma primitivo (GATA-6 positivas) misturadas e dispersas. Além disso, foi identificada coexpressão inadequada de marcadores em células do trofotoderma, o que não ocorre nos embriões *in vivo*.

Outro achado relevante foi a influência da velocidade de desenvolvimento *in vitro*. Embriões que atingiram o estágio de blastocisto mais tardiamente (após 9 dias) apresentaram uma dispersão ainda maior das células do epiblasto, maior distância média entre essas células e um número significativamente maior de células do endoderma primitivo, em comparação com embriões que se desenvolveram mais rapidamente (em 7 dias) (Umair et al., 2023). Essas observações indicam que os embriões IVP possuem deficiências no processo de segregação celular que podem comprometer sua viabilidade, sendo esses problemas mais acentuados em embriões de desenvolvimento lento.

8. 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. A baixa taxa de sucesso parece estar associada a múltiplos fatores, incluindo dificuldades na capacitação espermática, falhas na penetração da zona pelúcida e variações nos protocolos laboratoriais. Estudos mais recentes têm contribuído para o entendimento das condições ideais de capacitação, mas a reprodutibilidade dos resultados permanece limitada. Assim, embora o potencial da FIV em equinos ainda não tenha sido plenamente alcançado, os avanços nas metodologias de capacitação e fertilização oferecem perspectivas positivas para o desenvolvimento de protocolos mais eficientes no futuro.

Aspectos referentes à primeira divisão celular de um embrião equino, desde os processos iniciais de gametogênese até os eventos pós-fertilização mostram alterações bastante significativas na segregação cromossômica, o que levam a baixas taxas de blastocistos viáveis. Ainda, blastocistos equinos produzidos *in vitro* apresentam falhas na organização e segregação das linhagens celulares iniciais, em comparação aos embriões desenvolvidos *in vivo*. Essas alterações são ainda mais evidentes em embriões de



desenvolvimento mais lento, o que pode contribuir para a menor viabilidade embrionária observada clinicamente.

9. Referências

- Alm H, Torner H, Blottner S, Nürnberg G, Kanitz W.** 2001. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilization of horse oocytes. *Theriogenology*, 56:817–829.
- Amargant F, García D, Barragán M, Vassena R, Vernos I.** 2018. Functional analysis of human pathological semen samples in an oocyte cytoplasmic *ex vivo* system. *Sci Rep*, 8(1):1–10.
- Avidor-Reiss T, Mazur M, Fishman EL, Sindhvani P.** 2019. The role of sperm centrioles in human reproduction—the known and the unknown. *Front Cell Dev Biol*, 7:188.
- Ball BA, Hillman RB, Woods GL.** 1987. Survival of equine embryos transferred to normal and subfertile mares. *Theriogenology*, 28(16).
- Bedford SJ, Gowdy HL, Hinrichs K.** 1999. Comparison of the longevity of motility of stallion spermatozoa incubated at 38 degrees C in different capacitating media and containers. *Theriogenology*, 51:637–646.
- Bézar J, Magistrini M, Battut I, Duchamp G, Palmer E.** 1992. *In vitro* fertilization in the mare. *Rec Med Vet*, 168:993–1003.
- Blue BJ, McKinnon AO, Squires EL, Seidel GE Jr, Muscari KT.** 1989. Capacitation of stallion spermatozoa and fertilization of equine oocytes *in vitro*. *Equine Vet J*, 21:111–116.
- Capmany G, Taylor A, Braude PR, Bolton VN.** 1996. Cell cycle regulations: the timing of pronuclear formation, DNA synthesis and cleavage in the human 1-cell embryo. *Mol Hum Reprod*, 2(5):299–306.
- Carnevale EM, Maclellan LJ, Coutinho da Silva MA, Squires EL.** 2003. Pregnancies attained after collection and transfer of oocytes from ovaries of five euthanatized mares. *J Am Vet Med Assoc*, 222(1):60–62.
- Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Preis KA, Stokes JE, Squires EL.** 2004. Establishment of pregnancies from oocytes collected from the ovaries of euthanized mares. *Proc Annu Conv Am Assoc Equine Pract*, Denver, USA, 4–8 Dec:531–533.
- Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Panzani D, Stokes JE, Squires EL.** 2005. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology*, 64:519–527.
- Carnevale EM, Sessions DR.** 2012. *In vitro* production of equine embryos. *J Equine Vet Sci*, 32(7):367–371.
- 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.** 2021. Parental genome unification is highly error-prone in mammalian embryos. *Cell*, 184:2860–2877.
- Cheeseman IM, Desai A.** 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9:33–46.
- Choi YH, Love LB, Varner DD, Hinrichs K.** 2006. Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 66:955–963.
- Choi YH, Love LB, Varner DD, Hinrichs K.** 2007. 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. *Anim Reprod Sci*, 102:38–47.
- Claes A, Galli C, Colleoni S, Necchi D, Lazzari G, Deelen C, Beitsma M, Stout TA.** 2016. Factors influencing oocyte recovery and *in-vitro* production of equine embryos in a commercial OPU/ICSI program. *J Equine Vet Sci*, 100(41):68–69.
- Claes A, Cuervo-Arango J, van den Broek J, Galli C, Colleoni S, Lazzari G, Deelen C, Beitsma M, Stout TA.** 2019. Factors affecting the likelihood of pregnancy and embryonic loss after transfer of cryopreserved *in vitro* produced equine embryos. *Equine Vet J*, 51(4):446–450.
- Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TA.** 2019a. A retrospective comparison of the efficiency of different assisted reproductive techniques in the horse, emphasizing the impact of maternal age. *Theriogenology*, 132:36–44.
- Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TA.** 2018. Effect of embryo-recipient synchrony on post-ET survival of *in vivo* and *in vitro*-produced equine embryos. *J Equine Vet Sci*, 66:163–164.
- Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout TA.** 2019b. Mare and stallion effects on blastocyst production in a commercial equine ovum pick-up–intracytoplasmic sperm injection program. *Reprod Fertil Dev*, 31(12):1894–1903.



- Dai Y, Lee C, Hutchings A, Sun Y, Moor R.** 2000. Selective requirement for Cdc25C protein synthesis during meiotic progression in porcine oocytes. *Biol Reprod*, 62:519–532.
- Dell'Aquila ME, Albrizio M, Maritato F, Minoia P, Hinrichs K.** 2003. Meiotic competence of equine oocytes and pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as related to granulosa cell apoptosis. *Biol Reprod*, 68(6):2065–2072.
- Dell'Aquila ME, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F.** 1996. In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology*, 45:547–560.
- Felix MR, Turner RM, Dobbie T, Hinrichs K.** 2022. Successful in vitro fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation. *Biol Reprod*, 107(6):1551–1564.
- Fulka J Jr, Okolski A.** 1981. Culture of horse oocytes in vitro. *J Reprod Fertil*, 61(1):213–215.
- Galli C, Colleoni S, Claes A, Beitsma M, Deelen C, Necchi D, Duchi R, Lazzari G, Stout TA.** 2016. 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. *J Equine Vet Sci*, 100(41):82.
- Galli C, Colleoni S, Duchi R, Lagutina I, Lazzari G.** 2007. 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. *Anim Reprod Sci*, 98(1–2):39–55.
- Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G.** 2014. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology*, 81:138–151.
- Hawley LR, Enders AC, Hinrichs K.** 1995. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biol Reprod*, 52(Suppl 1):243–252.
- Hinrichs K, Choi YH, Love LB, Varner DD, Love C, Walckenaer BE.** 2005. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biol Reprod*, 72:1142–1150.
- Hinrichs K, Love CC, Brinsko SP, Choi YH, Varner DD.** 2002. 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*, 67:256–262.
- Hinrichs K, Choi YH, Norris JD, Love LB, Bedford-Guaus SJ, Hartman DL, Velez IC.** 2012. 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. *J Am Vet Med Assoc*, 241(8):1070–1074.
- Hinrichs K.** 2012. Assisted reproduction techniques in the horse. *Reprod Fertil Dev*, 25:80–93.
- Hinrichs K.** 2005. Update on equine ICSI and cloning. *Theriogenology*, 64(3):535–541.
- Jacobson CC, Choi YH, Hayden SS, Hinrichs K.** 2010. Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 73(8):1116–1126.
- Karki M, Keyhaninejad N, Shuster CB.** 2017. Precocious centriole disengagement and centrosome fragmentation induced by mitotic delay. *Nat Commun*, 8:15803.
- Kim NH, Simerly C, Funahashi H, Schatten G, Day BN.** 1996. Microtubule organization in porcine oocytes during fertilization and parthenogenesis. *Biol Reprod*, 54:1397–1404.
- Leemans B, Gadella BM, Stout TA, De Schauwer C, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A.** 2016. Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. *Reproduction*, 152:R233–R245.
- Lundin K, Bergh C, Hardarson T.** 2001. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod*, 16(12):2652–2657.
- Maclellan LJ, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Scoggin CF, Bruemmer JE, Squires EL.** 2002. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology*, 58:911–919.
- Maxwell SM, Colls P, Hodes-Wertz B, McCulloh DH, McCaffrey C, Wells D, Munne S, Grifo JA.** 2016. 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*, 106:1414–1419.e5.
- Mitchison TJ, Salmon ED.** 2001. Mitosis: A history of division. *Nat Cell Biol*, 3(1):E17–E21.
- O'Connor C.** 2008. Cell division: Stages of mitosis. *Nat Educ*, 1(1):188.
- Palmer E, Bezar J, Magistrini M, Duchamp G.** 1991. In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *J Reprod Fertil Suppl*, 44:375–384.



- Perry G.** 2013. 2012 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsl*, 31:1–67.
- Rader K, Choi YH, Hinrichs K.** 2016. Intracytoplasmic sperm injection, embryo culture, and transfer of *in vitro*–produced blastocysts. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 32:401–413.
- Reichmann J, Nijmeijer B, Hossain MJ, Eguren M, Schneider I, Politi AZ, Ellenberg J.** 2018. Dual-spindle formation in zygotes keeps parental genomes apart in early mammalian embryos. *Science*, 361(6398):189–193.
- Ribeiro BI, Love LB, Choi YH, Hinrichs K.** 2008. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Anim Reprod Sci*, 108:171–179.
- Rizzo M, Ducheyne KD, Deelen C, Beitsma M, Cristarella S, Quartuccio M, Stout TAE, de Ruijter-Villani M.** 2019. Advanced mare age impairs the ability of *in vitro*-matured oocytes to correctly align chromosomes on the metaphase plate. *Equine Vet J*, 51(2):252–257.
- Rizzo M, du Preez N, Ducheyne KD, Deelen C, Beitsma MM, Stout TAE, de Ruijter-Villani M.** 2020. The horse as a natural model to study reproductive aging-induced aneuploidy and weakened centromeric cohesion in oocytes. *Aging*, 12(21):22220–22232.
- Roasa LM, Choi YH, Love CC, Romo S, Varner DD, Hinrichs K.** 2007. Ejaculate and type of freezing extender affect rates of fertilization of horse oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 68:560–566.
- Ruggeri E, DeLuca KF, Galli C, Lazzari G, DeLuca JG, Stokes JE, Carnevale EM.** 2017. Use of confocal microscopy to evaluate equine zygote development after sperm injection of oocytes matured *in vivo* or *in vitro*. *Microsc Microanal*, 23(6):1197–1206.
- Schatten G.** 1994. Centrosome inheritance: The reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev Biol*, 165:299–335.
- Scheeren VFC, Larreategui-Aparicio A, Beitsma M, Deelen C, Papa FP, Claes A, Stout T, Ruijter-Villani M.** 2023. Centrosome fragmentation and malposition is common in the first cell division of equine ICSI embryos. *J Equine Vet Sci*, 125:104679.
- Shilton CA, Kahler A, Davis BW, Crabtree JR, Crowhurst J, McGladdery AJ, Wathes DCI, Raudsepp T, de Mestre AM.** 2020. Whole genome analysis reveals aneuploidies in early pregnancy loss in the horse. *Sci Rep*, 10:13314.
- Shin MR, Park SW, Shin H, Kim NH.** 2002. Nuclear and microtubule reorganization in nuclear-transferred bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 62:74–82.
- Simerly C, Wu G, Zoran S, Ord T, Rawlins R, Jones J, Navara C, Gerrity M, Rinehart J, Binor Z, Asch R, Schatten G.** 1995. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. *Nat Med*, 1:47–53.
- Simerly C, Zoran SS, Payno C, Dominko T, Sutovsky C, Navara CS, Salisbury JL, Schatten G.** 1999. Biparental inheritance of γ -tubulin during human fertilization: molecular reconstitution of functional zygotic centrosomes in inseminated human oocytes and in cell-free extracts nucleated by human sperm. *Mol Biol Cell*, 10:2955–2969.
- Squires EL.** 1996. Maturation and fertilization of equine oocytes. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 12(1):31–45.
- Steptoe PC, Edwards RG.** 1978. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 312:366.
- Stout TAE.** 2020. Clinical application of *in vitro* embryo production in the horse. *J Equine Vet Sci*, 89:103011.
- Tremoleda JL, Stout TA, Lagutina I, Lazzari G, Bevers MM, Colenbrander B, Galli C.** 2003. Effects of *in vitro* production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. *Biol Reprod*, 69:1895–1906.
- Tremoleda JL, Schoevers EJ, Stout TAE, Colenbrander B, Bevers MM.** 2001. Organization of the cytoskeleton during *in vitro* maturation of horse oocytes. *Mol Reprod Dev*, 60(2):260–269.
- Umair M, Scheeren VFC, Beitsma MM, Colleoni S, Galli C, Lazzari G, Ruijter-Villani M, Stout T, Claes A.** 2023. *In vitro*-produced equine blastocysts exhibit greater dispersal and intermingling of inner cell mass cells than *in vivo* embryos. *Int J Mol Sci*, 24(11):1–14.
- Yanagimachi R.** 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*, New York: Raven Press, p.189–317.
-