

EFEITO DE REPRODUTORES, DISTRIBUÍDOS EM TRÊS GRUPOS GENÉTICOS, NA PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES BOVINOS

(EFFECT OF BULLS OF THREE GENETIC GROUPS IN *in vitro* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS)

Y. F. WATANABE^{1,2}, E. B. de OLIVEIRA FILHO¹

RESUMO

O objetivo do trabalho foi comparar a produção *in vitro* de embriões bovinos utilizando sêmen de 8 touros, distribuídos em três grupos genéticos. Um total de 2759 oócitos aspirados de ovários colhidos em matadouro foram maturados *in vitro* em TCM 199 + 5% SFB (Soro Fetal Bovino) + 5% SVE (Soro de Vaca no Estro), em co-cultura com células da granulosa. Após 24 horas, os oócitos foram fecundados *in vitro* com sêmen das raças Pardo Suíço (2 touros), Holandês (2 touros) e Nelore (4 touros). O sêmen foi lavado e capacitado em heparina a 100 µg/ml por 15 minutos e diluído em meio TALP, para uma concentração de 10×10^6 células/ml. Quarenta e oito horas após a inseminação, os embriões clivados foram transferidos para monocamada de células epiteliais de oviduto em TCM 199 + 5% SFB + 5% SVE. Os embriões que se desenvolveram até os estádios de mórula e blastocisto, após 6-9 dias de co-cultivo, foram criopreservados ou transferidos para receptoras. Os dados foram avaliados mediante análise de variância, observando-se uma diferença altamente significativa entre os touros quanto à taxa de clivagem ($P < 0,001$; 37,8% a 63,9%) e entre grupos genéticos ($P < 0,05$; 48,3% a 54,3%). Em relação à produção de embriões (mórula/blastocisto), foi observada diferença significativa entre os touros (15,8% a 28,9%, $P < 0,01$) e, entre os grupos genéticos (21,5% a 27,7%, $P < 0,01$). Doze mórulas e dois blastocistos obtidos após 5-6 dias de cultivo *in vitro*, foram transferidos para sete receptoras, resultando numa taxa de prenhez e nascimento de 21,4% (3/14). Os resultados obtidos permitiram concluir que existe diferença entre touros, assim como para os diferentes grupos genéticos, na taxa de clivagem e no subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro*, podendo então, ser aplicada como um critério de seleção para fertilidade em touros antes de seu uso a campo.

PALAVRAS-CHAVE: fecundação *in vitro*, touros, fertilidade, embriões.

SUMMARY

The purpose of this work was to compare the embryo production by *in vitro* maturation, fertilization and culture, using semen of 8 bulls under 3 different genetic groups. A total of 2759 oocytes with compact cumulus obtained from slaughterhouse ovaries were put to *in vitro* maturation in TCM 199 + 5% BFS + 5% ECS, co-cultured with granulosa cells at 38,5°C in 5% CO₂ in air, during 24 hours. Following, the oocytes were fertilized with semen from the breeds Brown Swiss (2 bulls), Holstein (2 bulls) and Nelore (4 bulls). The semen was washed, capacitated in heparin at 100 µg/ml for 15 min. and diluted in TALP medium, to a concentration of 10×10^6 cells/ml. Forty-eight hours after insemination, cleaved embryos were transferred to oviduct cells monolayer in TCM 199 + 5% BFS + 5% ECS. The embryos which developed to the morula and blastocyst stage, after 6-9 days of co-culture, were cryopreserved or transferred to recipients. Data were evaluated by analysis of variance, where the cleavage rate was significantly different between bulls ($P < 0,001$ - 37,8% to 63,9%) and genetic groups ($P < 0,05$ - 48,5% to 54,3%). Concerning to the embryos production (morula/blastocyst), it was observed a significant difference between bulls ($P < 0,01$ - 15,8% to 28,9%) and genetic groups ($P < 0,01$ - 21,5% to 27,7%). Twelve

¹ Depto de Reprodução Animal - FCAVJ/UNESP. Rod. Carlos Tonanni, Km 5, 14870-000, Jaboticabal-SP.

² Depto de Genética - FMRP/USP. Av Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto-SP
(e.mail: yedawata@genbov.fmrp.usp.br)

morulae and two blastocysts, which were obtained 5 and 6 days after culture, were transferred to seven recipients, resulting in a pregnancy rate of 21,43% (3/14). It was concluded that exists a difference between bulls and genetic groups in cleavage and production of embryos and this test would be applied as criterion of selection for fertility in bulls before utilization on conditions.

KEY-WORDS: *in vitro* fertilization, bulls, fertility, embryos

INTRODUÇÃO

A aplicação a campo dos avanços das biotécnicas da reprodução no melhoramento genético animal pode e deve ser utilizada como uma ferramenta auxiliar na seleção de touros e matrizes.

Relativo aos touros, é imprescindível a escolha de reprodutores previamente selecionados e testados evitando-se, desta forma, a utilização de animais com alterações reprodutivas que possam interferir na fertilidade do mesmo e, principalmente, na transmissão de características indesejáveis aos descendentes. Este ponto é muito importante, uma vez que o macho pode, mediante a inseminação artificial, disseminar seu material genético para milhares de descendentes.

Portanto, a prática comercial da inseminação artificial em bovinos requer um método mais acurado para predizer a fertilidade do touro. Uma vez estabelecido que o animal possui atributos físicos necessários para o acasalamento, a meta agora é direcionar os estudos ao ejaculado. Geralmente, faz-se uma combinação de vários critérios, onde, no mínimo, o ejaculado deve ser cuidadosamente analisado para as características seminais clássicas, como volume, motilidade, concentração, cor, ausência de infecção e porcentagem de espermatozoides anormais. Embora muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de predizer a fertilidade do sêmen, o uso de um simples atributo é indesejável para atingir tal objetivo. Assim, a melhor metodologia utilizada na predição do potencial de fertilidade de um animal pelo exame de um ejaculado, após sua avaliação física, é o uso combinado de diversos parâmetros relativos à qualidade seminal aumentando, deste modo, a acurácia (SAACKE *et al.*, 1994; AMANN, 1995).

A fertilidade de touros pode ser definida como o sucesso do espermatozoide em fecundar o oócito, resultando na formação do zigoto, seguindo o desenvolvimento embrionário e fetal até o nascimento (EID *et al.*, 1994). Evidentemente, esta fertilidade *in vivo* apresenta uma variação entre os touros, a qual *in vitro* se apresenta de forma semelhante (SAACKE *et al.*, 1994).

Atualmente, novas tecnologias estão sendo empregadas na avaliação de reprodutores, como por exemplo a penetração espermática heteróloga em oócitos de hamster (BOUSQUET & BRACKETT, 1982),

morfologia e integridade do acrossoma, além da indução de reação acrossomal com diferentes glicosaminoglicanos (PARRISH & FOOTE, 1987; LENZ & MARTIN, 1988; WHITFIELD & PARKINSON, 1992; WATANABE *et al.*, 1997), a taxa de fecundação e produção *in vitro* de blastocistos (AOYAGI *et al.*, 1988; SHI *et al.*, 1990; MARQUANT-LE GUIENNE *et al.*, 1992; WATANABE *et al.*, 1995; 1996), além da presença de fatores no plasma seminal que podem influenciar a fertilidade dos machos (KILLIAN *et al.*, 1993)

Muitos estudos relatam que as diferenças individuais, quanto à fertilidade de reprodutores, são consequentes das anormalidades morfológicas ou funcionais dos espermatozoides como, por exemplo, a integridade do acrossoma e habilidade em sofrer reação acrossomal (CUMMING, 1995). Essas diferenças são devido a fatores intrínsecos do espermatozoide, os quais são selecionados durante seu trajeto no trato reprodutivo feminino, até alcançar o sítio de fecundação. Às vezes, espermatozoides com alterações morfológicas ou funcionais (anormais ou subfuncionais) podem penetrar no oócito, no entanto, este zigoto não segue um desenvolvimento embrionário normal. Tais espermatozoides de touros subfêteis podem ser detectados durante o processo de produção *in vitro* de embriões (MARQUANT-LE GUIENNE *et al.*, 1990).

Portanto, um método adequado para verificar a fertilidade de touros poderia ser efetuado mediante a fecundação *in vitro*, onde poder-se-á detectar espermatozoides de touros com baixa fertilidade. Estes resultados observados na fertilidade *in vitro* entre touros, consideram a habilidade do espermatozoide em fecundar o oócito e o zigoto prosseguir o desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto (LACALANDRA *et al.*, 1992; SHANSUDDIN & LARSSOM, 1993; WATANABE & OLIVEIRA FILHO, 1994; WATANABE *et al.*, 1994; GARNER, 1997). MARQUANT-LE GUIENNE *et al.* (1992) observaram uma alta correlação entre a produção *in vitro* de embriões e fertilidade a campo de touros distintos ($r=0,84$), utilizando diferentes concentrações de heparina.

Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de reprodutores, distribuídos em diferentes grupos genéticos, sobre a taxa de clivagem e o desenvolvimento *in vitro* dos embriões até os estádios de mórula e blastocisto.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita de Oócitos

Os oócitos foram aspirados de ovários de vacas e novilhas oriundos de abatedouros, sendo transportados ao laboratório dentro de 3 horas, em PBS acrescido de gentamicina (1,25 ml/l) previamente aquecido (37°C) e mantidos à temperatura ambiente. Os complexos cumulus-oócitos foram lavados duas vezes em meio TCM-199 com Hepes e 10% de soro fetal bovino - SFB (H199+). Somente os oócitos com cumulus compacto completo e citoplasma de coloração marrom e de aspecto homogêneo foram utilizados nos experimentos (N = 2759).

Maturação *in vitro*

Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram cultivados em placas contendo 3 ml de meio de maturação, TCM-199 suplementado com 5% de soro de vaca no estro e 5% de soro fetal bovino (B199+), em co-cultura com células da granulosa. Foram maturados, aproximadamente, 100 CCOs por placa a 38,5°C e 5% CO₂ em ar, durante 24 horas.

Ao término do cultivo, retirou-se uma amostra de oócitos, a qual foi fixada em metanol e ácido acético glacial (3:1) e corados com lacmóide (1% em ácido acético glacial) para observação da fase de maturação nuclear. O restante foi lavado duas vezes em meio de colheita sem soro (H199), antes de seguirem para a fecundação *in vitro*.

Reprodutores e sêmen

Foram utilizados, dentre vários touros provenientes de uma Central de Inseminação Artificial localizada no Estado de São Paulo, oito reprodutores com idade média entre 4 e 13 anos, distribuídos em três diferentes grupos genéticos (Nelore, Pardo Suíço e Holandês). O sêmen utilizado foi obtido de um mesmo ejaculado, o qual foi diluído em solução TRIS-gema e congelado.

Capacitação e fecundação *in vitro*

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C, durante 30 segundos e seu conteúdo submetido à técnica de lavagem, para a remoção do diluidor e plasma seminal, em meio TALP sem cálcio (Tyrode modificado com albumina, lactato e piruvato). Ao término da terceira lavagem, retirou-se uma alíquota de 5 µl do *pellet*, para determinação da concentração espermática em câmara hematocimétrica (Neubauer).

No restante do sedimento adicionou-se, na proporção de 1:1, meio TALP sem cálcio contendo heparina a 200 µg/ml. Dessa forma, a concentração final da heparina passou a ser 100 µg/ml. Após 15 minutos de incubação em 5% de CO₂ a 38,5°C, a suspensão foi diluída em meio de fecundação *in vitro* (TALP com cálcio), para uma

concentração espermática de 10x10⁶ células/ml, permanecendo sob incubação em atmosfera com 5% de CO₂ em ar a 38,5°C durante 1 hora e 30 minutos. A seguir, a suspensão contendo os espermatozóides foi homogeneizada para a preparação dos tubos de inseminação (200 µl/tubo).

Após a lavagem dos oócitos maturados *in vitro*, estes foram adicionados em grupos de 20 a 30 para cada tubo de inseminação.

Cultivo *in vitro*

Após 20 horas da inseminação, adicionou-se aos tubos 400 µl de meio de cultivo (B199 + 10% de SFB), onde as estruturas permaneceram nos tubos por mais 24 horas.

Decorridas 48 horas da inseminação dos oócitos, observou-se a taxa de clivagem (número de clivados sobre o total exposto à inseminação). Os embriões clivados foram co-cultivados em monocamada de células epiteliais de oviduto previamente estabelecida (6-7 dias) em meio de cultivo.

A troca do meio de cultivo das células de oviduto foi realizada após 3 dias do cultivo celular e no dia anterior do co-cultivo com os embriões.

A avaliação dos embriões foi realizada após 6-9 dias de co-cultivo e somente os embriões que atingiram os estádios de mórula e blastocisto foram considerados, os quais foram congelados ou transferidos.

Viabilidade Embrionária

Para a avaliação da viabilidade dos embriões produzidos *in vitro*, segundo a metodologia desenvolvida no presente trabalho, 12 mórulas e 2 blastocistos foram transferidos não cirurgicamente para o corno uterino de 7 receptoras (2 embriões/receptora). A taxa de prenhez foi avaliada por ultra-sonografia aos 28 dias e a sexagem do feto aos 60 dias pós-inseminação *in vitro*.

Análise Estatística

O número de embriões clivados, assim como o número de mórulas e blastocistos obtidos nas 5 repetições por reprodutor e nos diferentes grupos genéticos foram analisados mediante o modelo linear considerando o grupo genético, assim como os reprodutores, como efeitos fixos, através do procedimento GLM (General Linear Models) do SAS (SAS, 1987).

RESULTADOS

Após 24 horas de maturação *in vitro*, cerca de 90% dos oócitos apresentavam expansão do cumulus, entretanto a taxa de maturação avaliada após a fixação e coloração

de uma amostra de oócitos, pela presença de metáfase II, foi de 84,4% (346/410).

Um total de 2.279 oócitos foram inseminados com sêmen dos diferentes reprodutores (N=8), distribuídos nos grupos genéticos (N=3). Com relação à taxa de clivagem, o efeito do reprodutor foi significativamente diferente ($P < 0,001$), com variação de 37,8% a 63,9%. Também observou-se diferença significativa ($P < 0,01$) quanto à produção de embriões *in vitro* (mórulas e blastocistos), a qual variou de 15,8% a 28,9% (Tabela 1).

Em relação ao grupo genético, houve diferença

significativa tanto na taxa de clivagem ($P < 0,05$) quanto na produção de mórulas e blastocistos ($P < 0,01$). No entanto, estas apresentaram uma variação menor (48,3% a 54,3% e de 21,5% a 27,7%, respectivamente) quando comparada à variação individual (Tabela 2).

Após 20 dias da transferência dos embriões (N=14) constatou-se taxa de prenhez de 21,4% (3/14), pelo método de ultra-sonografia transretal, resultando no nascimento dos três primeiros bezerros provenientes de FIV no Brasil, entre 06 a 25 de fevereiro de 1994.

Tabela 01 - Taxa de clivagem e de embriões (Mo/Bl – mórulas e blastocistos) obtida de oócitos bovinos maturados e fecundados *in vitro* com sêmen de diferentes touros.

Touros	Oócitos Inseminados		Clivagem ^a		%Mo/Bl ^b	
		n	(%)	n	(%)	
1	303	171	(56,4)	74	(24,4)	
2	278	105	(37,8)	44	(15,8)	
3	296	132	(44,6)	64	(21,6)	
4	292	157	(53,8)	69	(23,6)	
5	301	136	(45,2)	81	(26,9)	
6	266	170	(63,9)	76	(28,6)	
7	277	125	(45,1)	71	(25,6)	
8	266	170	(63,9)	77	(28,9)	
Total	2279	1166	(51,2)	556	(24,4)	

^a $P < 0,001$; ^b $P < 0,01$

Tabela 02 - Taxa de clivagem e de embriões obtida de oócitos bovinos maturados e fecundados *in vitro* com sêmen de diferentes touros, distribuídos em três grupos genéticos.

Grupos Genéticos	Touros N	Oócitos Inseminados		Clivagem ^a		%Mo/Bl ^b	
			n	(%)	n	(%)	
Nelore	4	1169	565	(48,3)	251	(21,5)	
Pardo Suíço	2	567	306	(54,0)	157	(27,7)	
Holandês	2	543	295	(54,3)	148	(27,2)	

^a $P < 0,05$; ^b $P < 0,01$

DISCUSSÃO

A taxa de maturação nuclear *in vitro* obtida no experimento foi de 84,4% (346/410), sendo compatível com os trabalhos desenvolvidos por LEIBFRIED-RUTLEDGE *et al.* (1989) e MARQUANT-LE GUIENNE *et al.* (1990), onde os autores relataram que ambos os meios de maturação, com ou sem suplementação hormonal, foram eficientes. Os últimos autores obtiveram uma taxa de maturação de 90% e 88%, quando utilizaram meio B2 (Ménézo) suplementado com 20% de soro de vaca no estro (SVE) ou na presença de 20% de soro fetal bovino (SFB) e hormônios, respectivamente.

No presente trabalho, a taxa de clivagem apresentou

uma diferença significativa entre touros ($P < 0,001$) e entre os grupos genéticos ($P < 0,05$) a qual variou de 37,8% a 63,9% e 48,35% a 54,3%, respectivamente. Quanto à taxa de desenvolvimento dos embriões até o estágio de mórula e blastocisto, esta também diferiu significativamente entre os 8 touros estudados, assim como para os grupos genéticos ($P < 0,01$), observando-se uma variação de 15,8% a 28,9% e de 21,5% a 27,7%, respectivamente (WATANABE *et al.*, 1994; WATANABE & OLIVEIRA FILHO, 1994)

AOYAGI *et al.* (1988), examinando o efeito individual de touros na FIV, observaram que a taxa de fecundação de um touro foi significativamente inferior (52,5%; $P < 0,01$) quando comparada aos outros 5 touros, os quais não apresentaram diferença significativa entre eles

(84,2% a 93,5%). Em relação à taxa de clivagem, não foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) entre 5 touros, a qual variou de 39% a 48%; somente o touro que apresentou taxa de penetração inferior aos demais diferiu significativamente, com uma taxa de clivagem de 18% ($P < 0,01$). Os pesquisadores não encontraram diferença significativa entre os touros, quanto à taxa de mórula e blastocisto, após o cultivo *in vivo* em ovidutos de coelhas.

No entanto, quando SHI *et al.* (1990) analisaram a variação individual entre 9 touros quanto à taxa de fecundação e desenvolvimento *in vitro*, relataram diferenças significativas ($P < 0,01$) entre touros na taxa de clivagem (72,4% a 92,4%) e desenvolvimento até o estágio de blastocisto (10,6% a 30,5%), ressaltando a necessidade de seleção dos touros empregados no sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos.

Segundo MARQUANT-LE GUIENNE *et al.* (1990), quando avaliaram a fertilidade de 6 touros no laboratório, mediante técnicas de FIV, sendo a mesma conhecida a campo, observaram que a variação individual dos touros não reagiu da mesma maneira quando utilizou altas doses de heparina, indicando que a discriminação entre touros depende da concentração de glicosaminoglicanos no meio de FIV. No entanto, SHANSUDDIN & LARSSON (1993) não observaram efeito significativo entre diferentes doses de heparina e taxa de clivagem. O mesmo foi verificado por WATANABE *et al.* (1996) quando utilizaram diferentes concentrações de heparina (0,1; 1,0; 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e espermatozoides (2 e 4 x 10⁶ espermatozoides/ml) para os touros de alta e baixa fertilidade a campo, os quais obtiveram, em média, 20% e 3% de blastocistos, para os respectivos reprodutores, independente das concentrações de heparina e espermatozoides.

LACALANDRA *et al.* (1992), utilizando sêmen de 8 touros de diferentes raças, observaram diferenças significativas ($P < 0,05$ e $P < 0,01$) entre touros, não somente em relação à taxa de clivagem (14% a 72,8%), mas também na taxa de mórula (0 a 34,6%) e blastocisto (0 a 15,6%).

MARQUANT-LE GUIENNE *et al.* (1992) avaliaram a habilidade de fecundação *in vitro* de 12 reprodutores, juntamente com a avaliação a campo (taxa de não retorno). Os autores relataram que a taxa de não retorno entre os touros variou de 63,4% a 74,8% e a taxa de FIV entre 65,8% e 91,5%, verificando que somente a taxa de FIV não está relacionada com a fertilidade em nível de campo ($P < 0,05$), pois a taxa de FIV no presente estudo não permitiu distinguir os touros com alta ou baixa fertilidade *in vivo*. Ao contrário, uma alta correlação foi observada entre a média da taxa de embriões desenvolvidos *in vitro* e a taxa de não retorno ($r = 0,81$ e $P < 0,01$). Os autores concluíram que a habilidade fecundante individual de touros pode ser avaliada *in vitro* quando leva-se em conta, simultaneamente, a FIV e a taxa de desenvolvimento

embrionário. Como os estudos mostraram correlação significativa na produção *in vitro* de embriões bovinos e a fertilidade a campo entre touros, os autores sugerem a utilização da FIV em touros jovens para avaliação da fertilidade, antes de sua utilização a campo com a inseminação artificial.

O efeito significativo entre touros na taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário *in vitro* até os estádios de mórula e blastocisto leva à conclusão que há diferenças na capacidade individual de touros no processo de fecundação, onde poder-se-ia aplicar o teste de FIV para avaliar e prever a fertilidade individual de touros jovens antes de sua utilização em uma Central de Inseminação. Além do uso da técnica de FIV, a qual apresentou resultados satisfatórios para touros de alta e baixa fertilidade, a técnica de indução da reação acrossomal pode ser usada como testes laboratoriais para fertilidade com maior acurácia (WATANABE *et al.*, 1997).

Apesar do pequeno número amostral para os diferentes grupos genéticos estudados no presente experimento, foi possível observar uma diferença significativa entre eles, com taxa de clivagem superior aos grupos taurinos (54,0% e 54,3%) em relação ao zebuino (48,3%). Resultados semelhantes foram obtidos na produção de embriões, ou seja 27,2 e 27,7% de mórulas e blastocistos para os grupos taurinos e 21,5% para o zebuino (WATANABE *et al.*, 1994). Vale ressaltar que estudos destas biotécnicas em rebanho zebuino são escassos na literatura, uma vez que a maioria dos pesquisadores têm utilizado animais taurinos (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 1994).

Em suma, os resultados obtidos permitem concluir que, para a condução de um sistema de produção *in vitro* de embriões, a escolha dos touros, dentro de um mesmo grupo genético, é de importância fundamental para o êxito do processo. Há que se efetuar maiores estudos dentro desta linha, procurando ainda estabelecer uma correlação entre os resultados obtidos em nível laboratorial com o desempenho reprodutivo de touros a campo no Brasil.

Faz-se necessário ressaltar que o sistema de produção *in vitro* de embriões mostrou-se viável, resultando em prenhez e gestação a termo, demonstrando assim a viabilidade da técnica de FIV no laboratório (WATANABE *et al.*, 1993)

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Arcádio de los Reyes Borjes, professor visitante do Departamento de Genética da FMRP/USP, pela realização das análises estatísticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.P. The vital role of the epididymis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11. Belo Horizonte, MG. **Anais...** p. 213-221, 1995.
- AOYAGI, S. Effects of two treatments on semen from different bulls on *in vitro* fertilization on results of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.30, p.973-985, 1988.
- BOUSQUET, D.; BRACKETT, B.G. Penetration of zona free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. **Theriogenology**, v.17, p.199-223, 1982.
- CUMMING, I.R. Suitability of the intact acrosome method for the prediction of fertility in bovine artificial insemination. **Veterinary Record**, v.136, p.289-291, 1995.
- EID, L.N.; LORTON, S.P.; PARRISH, J.J. Paternal influence on S-phase in the first cycle of the bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v.51, p.1232-1237, 1994.
- GARNER, D.L. Ancillary tests of bull semen quality. In: THE VETERINARY CLINICS OF NORTH AMERICA: FOOD ANIMAL PRACTICE., v. 13, n. 2, p.313-330, 1997.
- KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility associated to holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1202-1207, 1993.
- LACALANDRA, G.M. *In vitro* fertility test of bull semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12. The Hague. **Proceedings...**, v.2, p.656-658, 1992.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.31, p.61-74, 1989.
- LENZ, R.W.; MARTIN, J.L. Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reactions in sperm with chondroitin sulfates. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.1073-1077, 1988.
- MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. **Reproduction Nutrition Development**, v.30, p.259-266, 1990.
- MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. *In vitro* fertilization as a tool to evaluate fertility in the bovine. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12. The Hague. **Proceedings...**, v.2, p.662-664, 1992.
- OLIVEIRA FILHO, E.B.; WATANABE, Y.F.; GARCIA, J.M. Establishment of an IVF program for zebu cattle (*Bos indicus*) in Brazil. **Theriogenology**, v.41, p.188, 1994.
- PARRISH, J.J.; FOOTE, R.H. Quantification of bovine sperm separation by swim-up method: relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. **Journal of Andrology**, v.8, p.259-266, 1987.
- SAACKE, R.G.; NADIR, S.; NEBEL, R.L. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. **Theriogenology**, v.41, p.45-50, 1994.
- SAS Institute Inc. SAS/STAT™ Guide for Personal Computers, Version 6 Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1987. 1028pp.
- SEIGEL, M.; GRAVES, C.N. Protein effects on bovine sperm acrosomal morphology and penetration and binding to bovine oocytes. **Journal of Animal Science**, v.53, p.591, 1981.
- SHANSUDDIN, M.; LARSSON, B. *In vitro* development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. **Reproduction in Domestic Animals**, v.28, p.77-84, 1993.
- SHI, D.S.; LU, K.H.; GORDON, I. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. **Theriogenology**, v.33, p.324, 1990.
- WATANABE, Y.F. Fecundação *in vitro* em bovinos de corte. Aplicação comercial. In: CURSO SOBRE AVALIAÇÃO GENÉTICA DE BOVINOS DE CORTE EM GOIÁS, 1, Goiânia-GO. **Anais...**, p.69-88, 1996.
- WATANABE, Y.F.; OLIVEIRA FILHO, E.B.; QUETGLAS, M.D.; GARCIA, J. M.; NOGUEIRA, M.F.G.; SILVA FILHO, I.R.; VANTINI, R.; BARROS, B.J.P. Desenvolvimento de gestação em bovinos com embriões produzidos em programa de fecundação *in vitro* (FIV). **Ars Veterinária**, v.9, n.2, p.191, 1993.
- WATANABE, Y.F.; OLIVEIRA FILHO, E.B. Efeito de touros na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Zootecnia**, v.32, p.35, 1994.
- WATANABE, Y.F.; de LOS REYES, A.B.; OLIVEIRA FILHO, E.B. Efeito do grupo genético de reprodutores na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Genética**, v.17, n.3, p.237, 1994.
- WATANABE, Y.F.; PERIPATO, A.C.; WATANABE, M.R.; GALERANI, M.A.V.; VILA, R.A.; LÔBO, R.B. A fecundação *in vitro* como um critério de seleção para fertilidade em touros da raça Nelore. **Revista Brasileira de Genética**, v.18, p.225, 1995.
- WATANABE, Y.F.; WATANABE, M.R.; AZAMBUJA, R.M.; PERIPATO, A.C.; VILA, R.A.; GALERANI, M.A.V.; LÔBO, R.B. Efeito de touros na produção *in vitro* de embriões com diferentes concentrações de heparina e de espermatozoides. **Arquivos da Faculdade de Veterinária - UFRGS**, v.24, p.250, 1996.
- WATANABE, Y.F.; PERIPATO, A.C.; WATANABE, M.R.; FRANCESCHINI, P.H.; FELICIANO SILVA, A.E.D.; LÔBO, R.B. Relationship between fertility of bovine semen, *in vitro* fertilization and acrosome reaction. In: INTERNATIONAL WORKSHOP - CRYOPRESERVATION IN REPRODUCTION FOR GENOME CONSERVATION, 1, Renaca, Chile. **Proceedings...**, p.40-41, 1997.
- WHITFIELD, C.H.; PARKINSON, T.J. Relationship between fertility of bovine semen and *in vitro* induction of acrosome reactions by heparin. **Theriogenology**, v.38, p.11-20, 1992.