

# UTILIZAÇÃO DE GLICEROL E ETILENOGLICOL COMO CRIOPROTETORES NA CONGELAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

RODRIGO FREITAS BITTENCOURT<sup>1</sup>, ANTÔNIO DE LISBOA RIBEIRO<sup>1</sup>, ANSELMO DOMINGOS FERREIRA SANTOS<sup>3</sup>, ROGÉRIO FURST<sup>3</sup>, RAFAEL BRUNO SANTOS TEIXEIRA<sup>1</sup>, MARCOS CHALHOUB<sup>1</sup>, ANA PAULA PORTELA<sup>1</sup>, SIDNEY GONÇALVES GONZALEZ ALVES<sup>1</sup>, ANA KARINE ALMEIDA<sup>1</sup> E JOSÉ DOMINGOS GUIMARÃES<sup>2</sup>

1. Escola de Medicina Veterinária, UFBA, Salvador, BA
2. Departamento de Medicina Veterinária, UFV, Viçosa, MG
3. Departamento de Zootecnia, UFV, Viçosa, MG

## RESUMO

Dez amostras de sêmen de dois reprodutores caprinos, da raça Parda-alpina, colhidas em vagina artificial, foram submetidas a quatro tratamentos para avaliação da eficiência do etilenoglicol e do glicerol, associados ou não ao EDTA, na criopreservação da célula espermática caprina. O diluente usado era à base de Tris-gema de ovo contendo 7% de glicerol (glicerol e glicerol+EDTA) ou 7% de etilenoglicol (etilenoglicol e etilenoglicol+EDTA), sendo que nos grupos glicerol+EDTA e etilenoglicol+EDTA foi associado ao diluente 0,1% de EDTA. As amostras foram mantidas por 60 minutos em geladeira a 4°C, onde então era efetuada a congelação em nitrogênio (-196°C). A

descongelação foi realizada em banho-maria a 37°C por 30 segundos. As médias obtidas para motilidade (%) a descongelação, para os grupos glicerol, glicerol+EDTA, etilenoglicol, etilenoglicol+EDTA, foram, respectivamente, 51%; 61%; 10% e 12%. Os grupos que utilizaram o glicerol como crioprotetor obtiveram melhores taxas de motilidade pós-descongelação, principalmente quando foi associado ao diluidor o EDTA (grupo glicerol+EDTA). Porém, esse resultado foi comprometido pelos maiores índices de alterações patológicas nos grupos que continham o glicerol.

**PALAVRAS-CHAVE:** Caprinos, criopreservação, sêmen, glicerol, etilenoglicol, EDTA.

## SUMMARY

### FREEZING GOAT SEMEN WITH GLYCEROL AND ETHYLENE GLYCOL AS CRYOPROTECTIVE AGENTS

The objective of this study was to evaluate the efficiency of the ethylene glycol and of the glycerol, associated or not to EDTA, in the cryopreservation of the goat semen. Ten ejaculates of two animals of the Alpine breeds, were collected and diluted in Tris-yolk containing 7% of glycerol (GLYCEROL and GLYCEROL+EDTA) or 7% of ethylene-glycol (ETHYLENE-GLYCOL and ETHYLENE-GLYCOL+EDTA), and in the groups GLYCEROL+EDTA and ETHYLENE-GLYCOL +EDTA was associated 0,1% of EDTA. The samples were maintained by 60 minutes in refrigerator to 4°C, and then freezed in nitrogen (-196°C).

The thawing was accomplished in 37°C water bath for 30 seconds. The averages obtained for sperm motilities (%) pos-thawing, for the groups GLYCEROL, GLYCEROL+EDTA, ETHYLENE-GLYCOL, ETHYLENE-GLYCOL+EDTA were respectively, 51%; 61%; 10%; 12%. The groups that used the glycerol as the crioprotetor obtained better motility rates pos-thawing, mainly when it was associated to the diluent the EDTA (group GLICEROL+EDTA). However, that result was committed by the rates of pathological alterations in the groups that contained the glycerol.

**KEYWORDS:** Goats, Cryopreservation, Sêmen, Glycerol, Ethylene glycol, EDTA.

## INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) tem um importante papel na criação de caprinos, especialmente em sistemas intensivos de produção, facilitando o controle reprodutivo e auxiliando na realização de testes de progênie mais precisos e em menor espaço de tempo (LEBOEUF et al., 2000).

A utilização da IA associada à congelação de sêmen tem como principal justificativa o melhoramento genético dos rebanhos, pela habilidade em produzir um grande número de descendentes por macho e em diferentes lugares ao mesmo tempo (LEBOEUF et al., 1998). Além disso, cria a possibilidade da manipulação e armazenamento de material genético (LEBOEUF et al., 2000).

Agentes crioprotetores são essenciais para a criopreservação de quase todos sistemas os biológicos (FAHY, 1986), ao serem adicionados ao diluidores seminais para a sobrevivência dos espermatozoides durante processo de congelação e descongelação (AMANN & PICKET, 1987).

O glicerol, um crioprotetor celular, é largamente utilizado para a congelação de sêmen caprino, cuja concentração usada em diferentes estudos varia de 3% a 9%, com melhores resultados entre 4% a 7% do diluente utilizado (LEBOEUF et al., 2000). O glicerol tem a função de aumentar o volume de canais de solventes descongelados e diluir as altas concentrações de sais durante o processo de resfriamento (SQUIRES et al., 1999). Apesar disso, a sua presença está relacionada com a queda da fertilidade do sêmen congelado, nos eqüinos, por exemplo (SQUIRES et al., 1999).

Assim, algumas substâncias classificadas como crioprotetores intracelulares têm sido utilizadas como uma alternativa para os diluidores de congelação de sêmen, como os crioagentes do grupo dos álcoois – etanol, etilenoglicol, metanol, polietilenoglicol e propilenoglicol – e as amidas, incluindo a acetamida, formamida, lactamida e dimetil-sulfóxido, além de outras (SNOECK, 2003).

Em estudo sobre o etilenoglicol à criopreservação do espermatozóide caprino, SOUZA et al. (2002) observaram que o grupo que continha o glicerol a 7% foi mais eficaz em preservar a motilidade

pós-descongelação, do que o grupo com etilenoglicol a 7%, embora não houvesse diferença ( $p>0,05$ ), entre os grupos, em relação às alterações morfológicas.

No entanto, MORAES et al. (1995), em ovinos, e MERCANTE et al. (1995), em eqüinos, não encontraram diferenças estatísticas para as variáveis motilidade e vigor espermático, respectivamente, entre os grupos que utilizaram glicerol (5%) e etilenoglicol (5%) como crioprotetores.

NEVES NETO et al. (1995), utilizando o mesmo diluidor e as mesmas concentrações de etilenoglicol e glicerol, encontraram melhores índices de éguas prenhes no sêmen congelado com etilenoglicol, o que demonstra a existência de um crioprotetor alternativo para a congelação de sêmen eqüino.

Apesar de ser grande o número de diluidores testados para a criopreservação de sêmen caprino, os métodos de congelação e a maioria desses diluentes usados são provenientes de trabalhos realizados com bovinos, com bons resultados (LEBOEUF et al., 2000).

Assim, dada a carência de estudos para o desenvolvimento de novos e melhores protocolos de congelação de sêmen caprino, em que o glicerol é o único crioprotetor universal da célula espermática caprina, esse estudo se propôs a testar a eficácia do glicerol (grupo controle) e do etilenoglicol, como um crioprotetor alternativo, em associação, ou não, ao EDTA, para a criopreservação do espermatozóide.

## MATERIAL E MÉTODOS

Procedeu-se à coleta de dez amostras de sêmen (10 ejaculados), de dois reprodutores caprinos (cinco de cada animal), da raça Parda-alpino-PO, e congelaram-se em torno de 400 doses – 100 para cada protocolo de processamento (4 grupos). Essas coletas eram realizadas diariamente, com a utilização de vagina artificial com água aquecida a 45°C, tendo como manequim uma fêmea em estro detectado por meio de um rufião. A amostra de sêmen era encaminhada imediatamente para o laboratório de processamento e colocado em banho-maria, à temperatura de 37°C, quando se realizava o exame

físico do ejaculado (volume, aspecto, turbilhonamento (0-5), do vigor (0-5) e da motilidade espermática (%)), tal como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Manual do CBRA, 1998). No mesmo momento também eram retiradas alíquotas para concentração (1:400) e para morfologia espermática, avaliadas posteriormente por preparação úmida em microscopia de contraste de fase.

O diluente usado era à base de Tris-gema de ovo (ROBERTS, 1986), contendo 7% de glicerol (glicerol e glicerol+EDTA) ou 7% de etilenoglicol (etileno e etileno+EDTA), e nos grupos glicerol+EDTA e etileno+EDTA foi associado ao diluente 0,1% de EDTA. O sêmen foi diluído em duas etapas. Na primeira, depois de retiradas alíquotas para motilidade, vigor, concentração e patologia, a amostra era dividida em quatro partes iguais e pré-diluídas em quatro tubos graduados cada um contendo 1 mL de cada diluente (glicerol, glicerol+EDTA, etileno, etileno+EDTA) aquecidos em banho-maria à 37°C, a fim de proteger o sêmen durante a sua manipulação. Feito o cálculo e procedida à diluição final, o sêmen era envasado em palhetas de 0,25 ml com dose inseminante de  $100 \times 10^6$  espermatozoides (SANTOS, 2001). Em seguida as amostras eram submetidas a 60 minutos de equilíbrio em geladeira a 4°C e depois colocadas em vapor de nitrogênio (N<sup>2</sup>), a 5 cm de altura da coluna líquida, por um período de 20 minutos, quando então efetuavam-se a congelação e o armazenamento em nitrogênio líquido a 196°C negativos.

As amostras de sêmen foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e avaliadas quanto à motilidade e ao vigor espermático, quando as partidas que não obtiveram os valores mínimos aceitáveis, de 30% de motilidade e 2 de vigor, pelo CBRA (1998), para sêmen caprino congelado, foram descartadas. Amostras com valores iguais ou acima dos mínimos foram submetidas ao teste de termorresistência (TTR) para o sêmen dos caprinos, também como preconizado pelo CBRA (1998). Para tanto, o sêmen descongelado foi colocado em tubos Eppendorfs e mantido por cinco minutos em banho-maria a 37°C. Em seguida, efetuou-se a avaliação

das variáveis motilidade (%) e vigor (0-5) por meio de microscópio ótico, em aumento de 200 vezes.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com os ejaculados sendo considerados repetições (n=10) e os protocolos de processamento do sêmen (glicerol; glicerol+EDTA; etilenoglicol e etilenoglicol+EDTA) considerados tratamentos (4). Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS) – versão 5.0 (1996). Para a consistência dos dados e a análise descritiva (médias e desvio-padrão) das características de interesse ao estudo empregou-se o PROC MEANS, cujas variáveis estudadas foram comparadas por meio do PROC GLM, utilizando-se o teste de Student – Newman – Keuls (SNK).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Características microscópicas do sêmen descongelado

Na Tabela 1 encontram-se as médias de motilidade e vigor para o sêmen fresco e para os quatro grupos (glicerol, glicerol+EDTA, etileno, etileno+EDTA), logo após a descongelação; e na Tabela 2, essas variáveis após o teste de termorresistência (TTR).

Nesse estudo os grupos que continham o glicerol a 7% obtiveram para motilidade e vigor, logo após a descongelação (Tabela 2), respectivamente, 51% e 3,15 (para o grupo glicerol), e 61% e 3,25 (para o grupo glicerol+EDTA). Após o TTR (Tabela 2), as médias encontradas para motilidade e vigor foram, respectivamente, 45% e 3 (para o grupo glicerol), e 54% e 3,1 para o grupo glicerol+EDTA. As taxas de motilidade e vigor (Tabela 1 e Tabela 2), obtidas pelos grupos que utilizaram o glicerol como crioprotetor (glicerol, glicerol+EDTA), foram muito superiores ( $p < 0,0001$ ) às médias obtidas pelos grupos que utilizaram o etilenoglicol como crioprotetor (etileno e etileno+EDTA). Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por SILVASELVAM et al. (2000), que ao compararem o glicerol e o etilenoglicol, nas mesmas concentrações (5, 7, e 10%), baseando-se na motilidade e vigor espermático pós-

descongelção, concluíram que o glicerol a 7% foi o protocolo mais eficaz na crioproteção da célula espermática caprina.

Ao avaliarem a utilização do glicerol e do etilenoglicol, também a 7%, para a congelção do sêmen caprino, SOUZA et al. (2002) encontraram médias para a motilidade e o vigor espermático pós-descongelção de 53,1% e 3,3, para o grupo com glicerol, e 10,7% e 2, para o grupo com etilenoglicol, semelhante às médias encontradas nesse experimento, de 51% e 3,15 (Tabela 1), para o grupo glicerol (glicerol), e de 10% e 1,4 para o grupo etileno (etilenoglicol). Esses resultados, novamente, confirmam a superioridade do glicerol em relação ao etilenoglicol, quando testados na mesma concentração, para a criopreservação de sêmen caprino.

No entanto, MORAES et al. (1995), em ovinos, e MERCANTE et al. (1995), em eqüinos, não encontraram diferenças estatísticas para as variáveis motilidade e vigor espermático, respectivamente, entre os grupos que utilizaram glicerol e etilenoglicol como crioprotetores.

No grupo glicerol+EDTA, que utilizou 0,1% de EDTA associado ao diluente, foi obtida uma implementação de 10% na motilidade pós-descongelção, quando comparado com o grupo que não o utilizou, com alta significância estatística (Tabela 1). Isso também foi descrito por DHAMI et al. (1993), ao utilizarem o EDTA nessa mesma concentração em diluentes para criopreservação de sêmen bovino, o que pode ser explicado pela ação do EDTA de quelar o cálcio no meio extracelular, diminuindo seu influxo para o meio intracelular no processo de resfriamento (WATSON, 1981). Isso ocorre pela concentração de cálcio intracelular, que aumenta na proporção em que cai a temperatura, cujo acúmulo intracelular pode se tornar irreversível a temperaturas abaixo de 16°C (ROBERTSON & WATSON, 1986). Já o aumento do cálcio intracelular (proveniente do processo de resfriamento) está diretamente relacionado com a

perda irreversível da motilidade espermática, de modo que a adição do EDTA pode inibir o acúmulo desse cálcio provocado pelo choque térmico (KARAGIANNIDIS, 1976).

Após o TTR, porém, não foi verificada diferença estatística, para a variável motilidade, entre os grupos glicerol e glicerol+EDTA (Tabela 2).

#### Características morfológicas do sêmen descongelado

Apesar da maior motilidade observada para o grupo glicerol+EDTA (Tabela 3), esse grupo apresentou, significativamente ( $p < 0,0001$ ), maior índice de alterações morfológicas quando comparado com o grupo com glicerol, que não continha o EDTA (glicerol), como por exemplo percentagem de defeitos maiores (DM), com 72,6% para o grupo glicerol+EDTA e 48,1% para o grupo glicerol.

Fica caracterizado, na Tabela 3, o número significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) de patologias espermáticas para os grupos que utilizaram o glicerol como crioprotetor. E, apesar das baixas taxas de motilidade pós-descongelção para os grupos que utilizaram o etilenoglicol como crioprotetor espermático, este foi mais eficaz na proteção contra os efeitos deletérios do processo de criopreservação. Pode-se citar como exemplo a percentagem de defeitos espermáticos totais (DT) para os grupos etileno e etileno+EDTA, que foram, respectivamente, 13,5% e 19,2%, enquanto que para os grupos glicerol e glicerol+EDTA esses valores foram de 58% e 83,88%.

Esses resultados são diferentes dos relatados por SOUZA et al. (2002). Em estudo realizado para congelção do sêmen caprino, eles utilizaram os mesmos crioprotetores nas mesmas concentrações que este experimento, e não observaram diferença estatística para o número de alterações morfológicas, entre os grupos com glicerol e com etilenoglicol.

**TABELA 1.** Médias de motilidade e vigor para os espermatozoides do sêmen fresco, e para os quatro tratamentos (glicerol, glicerol+EDTA, etileno e etileno+EDTA), logo após a descongelação.

Tratamento	Motilidade	Vigor
Sêmen fresco	86,00 ± 3,16 a	4,05 ± 0,16 a
Glicerol	51,00 ± 6,14 c	3,15 ± 0,24 b
Glicerol+EDTA	61,00 ± 8,43 b	3,25 ± 0,26 b
Etileno	10,00 ± 12,47 d	1,4 ± 1,22 c
Etileno+EDTA	12,00 ± 13,98 d	2,0 ± 1,13 c

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si ( $p < 0,0001$ ) pelo teste SNK.

**TABELA 2.** Médias de motilidade e vigor para os espermatozoides dos quatro tratamentos (glicerol, glicerol+EDTA, etileno e etileno+EDTA), logo após o teste de termorresistência.

Tratamento	Motilidade	Vigor
Glicerol	45,0 ± 7,45 a	3,0 ± 0,24 a
Glicerol+EDTA	54,0 ± 11,74 a	3,1 ± 0,32 a
Etileno	3,50 ± 7,47 b	0,5 ± 1,08 b
Etileno+EDTA	5,0 ± 15,81 b	0,3 ± 0,95 b

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si ( $p < 0,0001$ ) pelo teste SNK.

**TABELA 3.** Médias de defeitos maiores (DM), defeitos menores (DME) e defeitos totais (DT) para os espermatozoides do sêmen fresco, e para os quatro tratamentos (glicerol, glicerol+EDTA, etileno e etileno+EDTA).

Tratamento	DM	DME	DT
Sêmen fresco	8,25 ± 4,56 a	7,38 ± 5,26 ab	15,75 ± 7,3 a
Glicerol	48,10 ± 16,13 b	12,10 ± 3,13 b	58,0 ± 18,36 b
Glicerol+EDTA	72,63 ± 21,38 c	13,75 ± 6,85 b	83,88 ± 13,53 c
Etileno	11,25 ± 1,89 a	2,00 ± 0,82 a	13,50 ± 1,73 a
Etileno+EDTA	12,20 ± 5,59 a	7,00 ± 3,74 ab	19,20 ± 8,58 a

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si ( $p < 0,0094$ ) pelo teste SNK.

## CONCLUSÕES

Neste estudo, a utilização do etilenoglicol na concentração de 7%, apesar de ter preservado melhor as características morfológicas e as estruturas de membrana do espermatozoide, teve seu resultado comprometido, provavelmente pela sua atividade tóxica sobre o espermatozoide.

O sêmen congelado nos meios contendo o glicerol a 7% apresentou melhores taxas de motilidade a descongelação, porém nesses grupos foram observados maiores índices de alterações patológicas.

A associação do EDTA aos diluidores promoveu uma melhora da taxa de motilidade pós-descongelação, quando comparado com tratamento que não o continha, porém esse melhor desempenho foi prejudicado pelo maior índice de alterações morfológicas observadas no grupo glicerol+EDTA em relação ao grupo glicerol.

Sugere-se o desenvolvimento de novos estudos utilizando menores concentrações de etilenoglicol nos diluentes de congelação de sêmen caprino, já que a concentração utilizada neste estudo foi superior às relatadas na literatura.

Sugerem-se também novos experimentos com a utilização de tempos de equilíbrio superiores ao utilizado neste experimento (60 minutos), em que o glicerol é usado como crioprotetor celular.

## AGRADECIMENTOS

Ao Fundo de Auxílio Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb).

## REFERÊNCIAS

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of stallion

spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-174, 1987.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2 ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

DHAMI, A.J.; MOHAN, G.; SAHNI, K.L. Effect of extenders and additives on preservability of cattle and buffalo semen at 5°C and -196°C. **Indian Journal-of-Animal-Sciences**, v. 63, n. 5, p. 492-498. 1993.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**, v. 23, n. 1, p. 1-13, 1986.

KARAGIANNIDIS, A. The distribution of calcium in bovine spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 46, n. 1, p. 83-90, 1976.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000.

LEBOEUF, B.; MANFREDI, E.; BOUE, P.; PIACÈRE, A.; BRICE, G.; BARIL, G.; BROQUA, C.; HUMBLLOT, P.; TERQUI, M. Artificial insemination of dairy goats in France. **Livestock Production Science**, v. 55, p. 193-203, 1998.

MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P.; NEVES NETO, J.R.; VISINTIN, J.A.; FAGUNDES, A.C. Congelação de sêmen eqüino em etilenoglicol ou glicerol: motilidade, vigor e teste de termorresistência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 290.

MORAES, C.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; SCHWEITZER, C.M.; LUZ, S.L.N. Eficácia do etilenoglicol na criopreservação do sêmen ovino congelado em *pellets*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 312.

NEVES NETO, F.R.; MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P. Fertilidade do sêmen eqüino con-

gelado com etilenoglicol ou glicerol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995. Belo Horizonte, MG: **Anais...** Belo Horizonte, MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 292.

ROBERTS, S. J. **Veterinary obstetrics and genital diseases**. 3.ed. Michigan: Edwards Brothers, 1986. 981p.

ROBERTSON, L.; WATSON, P.F. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. **Journal Reproduction Fertility**, v. 77, n. 1, p. 177-185, 1986.

SANTOS, A.D.F. **Características reprodutivas e congelamento do sêmen de reprodutores das raças Alpina e Saanen submetidos ao manejo de fotoperíodo**. 2001, 61f. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

SIVASELVAM, S.N.; EDWIN, M.J.; SUBRAMANIAN, A.; RAHUMATHULLA, P.S.; NATARAJAN, N. Cryopreservation of goat semen: standardisation of a freezing protocol. **Cheiron**, v. 29, n. 3-4, p. 73-76, 2000.

SNOECK, P.P.das N. **Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino**: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade. 2003, 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.

SOUZA, A.F.; GUERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M.; MERGULHÃO, F.C.C.; NEVES, A.C.; WISCHRAL, A. Congelação de sêmen caprino utilizando os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl. 5, p. 103-105, 2002.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; VANDERWALL, D.K.; Mc CUE, P.M.; BRUEMMER, J. *Cooled and frozen stallion semen*. Fort Collins: Colorado State University. 1999. 80p. (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin. n.9).

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G.J.; CLARKE, A. (Eds.) *Effects of low temperatures on biological membranes*. London: Academic Press, 1981. p. 189.