

ACTIVACIÓN QUÍMICA DE OVOCITOS DE ALPACA VITRIFICADOS DESPUÉS DE LA MADURACIÓN *IN VITRO*

CHEMICAL ACTIVATION OF ALPACA OOCYTES VITRIFIED AFTER *IN VITRO* MATURATION

Jaime Ruiz B.^{1,2,3,4}, Leandra Landeo J.¹, Marino Artica F.¹, Marcelo Ratto F.³,
Jorge Correa S.³

RESUMEN

Se evaluó la viabilidad posdescongelamiento de ovocitos de alpaca vitrificados luego de la maduración *in vitro*. Los ovocitos fueron recuperados de ovarios obtenidos en el camal Municipal de Huancavelica, Perú, madurados *in vitro* por 24-25 h en una cámara modular con 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂ en medio TCM-199 suplementado con Piruvato de Na, HEPES, sulfato de gentamicina, FSH, estradiol 17-β y suero fetal bovino. Los ovocitos fueron separados de las células de la granulosa con hialuronidasa al 0.1% y distribuidos en tres tratamientos: T1 (n=107), ovocitos expuestos a las soluciones crioprotectoras y vitrificados; T2 (n=121), ovocitos expuestos a las soluciones crioprotectoras no vitrificados (control de toxicidad de los crioprotectantes); T3 (n=232), grupo control de ovocitos no expuestos a las soluciones vitrificantes. Los ovocitos fueron vitrificados en microgotas sobre un papel de aluminio flotando en nitrógeno líquido, utilizando una solución de equilibrio con 4% de etilenglicol y una solución de vitrificación con 35% de etilenglicol, 5% de polivinilpirrolidona y 0.4 M de trehalosa. Las microgotas vitrificadas se almacenaron en nitrógeno líquido y fueron descongeladas 1-4 después. Todos los ovocitos fueron cultivados en SOF-HEPES con 5 μM de ionomicina de Ca por 4 min a temperatura ambiente y luego cultivados por 3 h en 6-DMAP a 38.5 °C en una atmósfera húmeda con 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂. Luego se cultivaron por 8 d en medio SOF-IVC. Se encontró 58.4, 68.7 y 97.3% de ovocitos morfológicamente normales para T1, T2 y T3, respectivamente. Las tasas de segmentación fueron de 39.9, 49.5 y 62.3%, y las tasas de blastocistos fueron de 0, 0 y 9.2% para T1, T2 y T3, respectivamente. Los resultados demuestran que los ovocitos de alpaca pueden ser vitrificados con el método de superficie sólida y que son viables morfológicamente y fisiológicamente posdescongelamiento.

Palabras clave: vitrificación, ovocitos, alpaca, partenogénesis

¹ Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas, Departamento Académico de Zootecnia, Universidad Nacional de Huancavelica, Perú

² E-mail: jaruizbejar@yahoo.es

³ Instituto de Reproducción Animal, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

⁴ Estudio financiado con recursos del Fondo de Desarrollo Socioeconómico de Camisea (FOCAM)

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the viability of vitrified/thawed alpaca oocytes after *in vitro* maturation. Alpaca oocytes were retrieved from ovaries obtained in the slaughterhouse of Huancavelica, Peru and matured *in vitro* for 24-25 h in a modular chamber with 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ in TCM-199 medium supplemented with sodium pyruvate, HEPES, gentamycin sulphate, FSH, estradiol 17-β and fetal calf serum. Then, oocytes were fully denuded of cumulus cells with 0.1% hyaluronidase and assigned to three treatments: T1 (n=107), oocytes exposed to cryoprotectants and vitrified; T2 (n=121), oocytes exposed to cryoprotectants without vitrification; and T3 (n=232), control group of oocytes not exposed to vitrification solutions. Alpaca oocytes were vitrified in microdrops on a precooled aluminum foil floating in liquid nitrogen, using an equilibrium solution with 4% ethylene glycol and a vitrification solution with 35% ethylene glycol, 5% polyvinyl-pyrrolidone and 0.4 M trehalose. The vitrified microdrops were stored in liquid nitrogen and were thawed 1-4 d later. All oocytes were cultured on SOF-HEPES with 5 μM Ca ionomycin by 4 min at room temperature followed by 3 h incubation in 6-DMAP at 38.5 °C in a 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ in humidified atmosphere. Subsequently, were cultivated on mSOF medium during 8 days. The rates of oocytes survival were 58.4, 68.7 and 97.3% in T1, T2 and T3 respectively. The rates of cleavage were 39.9, 49.5 and 62.3% and rates of development to blastocysts were 0, 0 and 9.2% in T1, T2 and T3 respectively. The results showed that alpaca oocytes were morphologically and physiologically viable after vitrification by solid surface method.

Key words: vitrification, oocytes, alpaca, parthenogenesis

INTRODUCCIÓN

No hay estudios de activación química para la producción de embriones partenogénicos en alpacas o en otras especies de camélidos sudamericanos (CSA) con ovocitos previamente vitrificados; sin embargo, hay estudios que han demostrado la vitrificación de embriones de llama (Aller *et al.*, 2002; Lattanzi *et al.*, 2002), incluyendo la transferencia exitosa en receptoras sincronizadas (Aller *et al.*, 2002).

En los últimos años, se ha incrementado el interés en la criopreservación de ovocitos, especialmente por la importancia de la producción *in vitro* de embriones y la transferencia nuclear (Dinnyes *et al.*, 2000). Sin embargo, la disponibilidad de ovocitos es la principal limitante, sobretodo en CSA, por la lejanía de los centros de crianza y por el bajo número de camales para el beneficio de estas especies. Esta realidad dificulta la imple-

mentación de líneas de investigación en la producción *in vitro* de embriones (Ruiz, 2009).

La vitrificación es una tecnología que ha superado a la congelación tradicional en la criopreservación de ovocitos, mejorando las tasas de supervivencia posdescongelamiento y de desarrollo embrionario *in vitro* en muchas especies domésticas (Albarracín, 2005). La vitrificación en superficie sólida ha dado buenos resultados en la criopreservación de ovocitos bovinos (Dinnyes *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2010), e incluso ha permitido la producción de embriones con tecnologías avanzadas como la clonación por transferencia nuclear (Atabay *et al.*, 2004). Además, se la logrado la vitrificación exitosa de ovocitos en caprinos (Begin *et al.*, 2003), porcinos (Somfai *et al.*, 2007) y ovinos (Zhang *et al.*, 2009); sin embargo, los resultados de supervivencia, segmentación y de obtención de blastocistos son menores a los obtenidos con la vitrificación de ovocitos bovinos.

El proceso de vitrificación requiere la presencia de una alta concentración de soluciones crioprotectoras permeables y una alta velocidad de enfriamiento (Atabay *et al.*, 2004) para facilitar el rápido intercambio del agua intracelular por el crioprotector y evitar la formación de cristales de hielo. Esto se logra reduciendo al mínimo el volumen de las soluciones crioprotectoras y aumentando la velocidad de enfriamiento (Uribe, 2008), lo cual permite minimizar el daño celular que se provoca por el estrés osmótico o la toxicidad química provocada por las altas concentraciones de las soluciones crioprotectoras (Atabay *et al.*, 2004). Por ello, se debe realizar un control de toxicidad exponiendo los ovocitos a las soluciones vitrificantes y luego lavarlos sin someterlos a la vitrificación, para asegurar que una solución crioprotectora no afecta la supervivencia de los ovocitos.

La vitrificación de ovocitos de alpacas abre la posibilidad de almacenar material genético de hembras de comprobada calidad genética, y producir crías aun después de la muerte de las donantes de ovocitos. Además, hay que considerar la limitante que tienen las alpacas hembras de producir menos de seis crías durante toda su vida reproductiva. Asimismo, la técnica de vitrificación podría aplicarse para la criopreservación de ovocitos de CSA silvestres como la vicuña y el guanaco, o para producir embriones por fecundación *in vitro* o por transferencia nuclear.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la vitrificación en superficie sólida sobre la viabilidad de ovocitos de alpaca activados químicamente para la producción de embriones partenogenéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección y Maduración de Complejos Ovocito-Cúmulo

Se recuperaron 96 ovarios de alpaca en el Camal Municipal de Huancavelica, Perú,

ubicado a 3680 msnm, y llevados en termos a temperatura ambiente al Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica, dentro de las tres horas siguientes al sacrificio de los animales. Los ovarios fueron recolectados 2 veces por semana durante 8 semanas.

Folículos pequeños (2-6 mm) se aspiraron con ayuda de agujas 21 G en jeringas de 5 ml. Se recolectaron en promedio 3.5 complejos ovocito-cumulus (COCs) por ovario, recuperándose 667 COCs, y siendo seleccionado el 69% de ellos como apto para la maduración *in vitro*. Se consideraron como aptos cuando tenían dos o más capas de células de la granulosa rodeando al ovocito y con un citoplasma de color homogéneo, siendo descartados los ovocitos con cúmulo expandido, parcial o totalmente desprovistos de células de la granulosa (Ratto *et al.*, 2005).

El líquido folicular con los COCs recuperados se depositó en tubos de 15 ml y mantenido a 37 °C, decantándose por 20 minutos. Se aspiró el sedimento, se depositó en placas Petri y se diluyó en medio de oviducto sintético modificado suplementado con 25 mM HEPES (mSOF-HEPES, Takahashi y First, 1992) y 1 mg/ml de albúmina sérica bovina. Se seleccionaron los COCs bajo un microscopio estereoscópico y se maduraron *in vitro* por 24-25 horas en gotas de 50 μ l (8-12 COCs/gota) en una cámara modular con atmósfera húmeda de 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ a 38.5 °C, usando un medio de cultivo de tejidos (TCM-199) suplementado con 25 mM de HEPES, Piruvato de Na 0.2 mM, sulfato de gentamicina 50 μ g/ml, FSH 0.02 unidades/ml, estradiol 17- β 1 μ g/ml y suero fetal bovino al 10% (v/v). Luego de la maduración, se separaron las células del cúmulo agitando los ovocitos con un vortex por 2 minutos en una solución mSOF-HEPES adicionada de hialuronidasa al 0.1%. Los ovocitos se lavaron, al menos 2 veces, en mSOF-HEPES y se seleccionaron con la ayuda de un microscopio invertido con aumento de 40x. Aquellos en metafase II con un primer corpúsculo polar visible fueron considerados como ovocitos maduros.

Vitrificación de Ovocitos

Se utilizó el procedimiento de vitrificación en superficie sólida descrito por Dinnyes *et al.* (2000) con algunas modificaciones introducidas por Atabay *et al.* (2004). Ovocitos maduros, libres de células del cúmulo, se suspendieron en una solución de equilibrio (SVI) (4% etilenglicol [EG] diluido en solución base [SB] compuesta por TCM-199 con 25 mM de HEPES, suplementado con 20% de suero fetal bovino y 50 μ g/ml de sulfato de gentamicina) por 12 a 15 minutos sobre una platina temperada a 39 °C. Luego, los ovocitos se colocaron en una solución de vitrificación (SVII) (35% EG, 5% de polivinilpirrolidona [PVP] y 0.4 M trehalosa [TRE]) en SB por 30 segundos. Inmediatamente después, microgotas de 3.5 μ l de SVII conteniendo 3 a 5 ovocitos se dejaron caer sobre una superficie de papel de aluminio preenfriado flotando en nitrógeno líquido. Las microgotas vitrificadas fueron transferidas con una pinza preenfriada hacia un vial criogénico de plástico de 2 ml preenfriado y se almacenaron en nitrógeno líquido durante 1 a 4 días hasta su uso.

Descongelamiento de Ovocitos

Se siguió el método descrito por Ruiz *et al.* (2010). Las microgotas vitrificadas se dejaron caer sobre una solución de 2 ml de TRE 0.3M en SB por 5 minutos. Los ovocitos se transfirieron a SB por 2 minutos; se lavaron tres veces en mSOF-HEPES y se colocaron en medio de maduración fresco por 30 minutos antes de la activación química, para permitir que recuperen su forma esférica normal. Se seleccionaron los ovocitos sobrevivientes a la criopreservación de acuerdo a la integridad de la zona pelúcida y la presencia de un ooplasma de color y forma homogéneo. Los demás fueron descartados.

Activación Química de Ovocitos

La activación química se hizo de acuerdo al protocolo descrito por Ruiz *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Para ello, se

formaron tres grupos de ovocitos de acuerdo a: I) ovocitos expuestos a las soluciones crioprotectoras y vitrificados, II) ovocitos expuestos a las soluciones crioprotectoras y no vitrificados (control de toxicidad de los crioprotectantes), y III) grupo control de ovocitos no expuestos a las soluciones vitrificantes. Los ovocitos se cultivaron en mSOF-HEPES conteniendo 5 μ M de ionomicina de Ca por 4 minutos a 39 °C e inmediatamente después cultivados en gotas de 80 μ l de mSOF-IVC suplementado con 3 mg/ml de BSA, 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP, Sigma) y 12.5 μ M de citocalasina B (Sigma) por 3 horas en atmósfera húmeda en una cámara modular con 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂ al aire a 38.5 °C.

Cultivo *in vitro* de Embriones

Luego de la activación artificial, los ovocitos se cultivaron de acuerdo al protocolo descrito por Martínez Díaz *et al.* (2007), por 8 días en gotas de 40 μ l de mSOF suplementado con 3 mg/ml de BSA en una cámara modular de cultivo a 38.5 °C en atmósfera húmeda con 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂ al aire. Se evaluó, con un microscopio invertido a 40x, la tasa de segmentación a los 2 días y la tasa de blastocistos obtenidos a los 8 días de desarrollo posactivación química de los ovocitos.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de segmentación y de blastocistos en cada una de las réplicas evaluadas se expresaron en porcentaje. La tasa de blastocistos se calculó en base a los ovocitos segmentados. Los resultados fueron analizados utilizando análisis de varianza para un diseño completamente al azar, después de la transformación arcsen de los datos. Se utilizó la prueba de Duncan para contrastar la diferencia entre promedios ($p < 0.05$). Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico SAS v. 8.02 para Windows.

Cuadro 1. Tasas de supervivencia, de segmentación y de blastocistos de ovocitos de alpaca

Ovocitos	N.º	Sobrevivientes posvitricación o posexposición n (% ± de)	Activados (réplicas)	Segmentación 2 días n (% ± de)	Blastocistos 8 días n (% ± de)
Vitrificados	107	64 (58.4±12.5) ^b	64 (7)	23 (39.9±8.8) ^b	0 ^b
Expuestos	121	82 (68.7±7.2) ^b	82 (8)	43 (49.5±11.2) ^{a,b}	0 ^b
No expuestos	232	224 (97.3±2.0) ^a	224 (7)	142 (62.3±4.4) ^a	13 (9.2±8.5) ^a

^{a,b} Letras diferentes dentro de columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ovocitos vitrificados y los expuestos (Tratamientos I y II) tuvieron menores tasas de supervivencia comparado con los ovocitos no expuestos ($p < 0.05$, Cuadro 1). Los ovocitos que fueron afectados por la exposición a las soluciones vitrificantes presentaron el citoplasma contraído y muy separado de la zona pelúcida, y el espacio vitelino muy grande. Algunos presentaban formas irregulares (elípticas u ovoides), diferente a la forma circular normal del ovocito. Además, algunos ovocitos vitrificados dañados por la criopreservación presentaron la zona pelúcida quebrada.

No hubo diferencias estadísticas con relación a las tasas de segmentación entre ovocitos vitrificados y los expuestos a las soluciones de vitricación; sin embargo, los ovocitos frescos tuvieron una tasa de segmentación superior ($p < 0.05$) a los ovocitos vitrificados. No se obtuvo blastocistos a partir de ovocitos vitrificados/descongelados y de ovocitos expuestos (Cuadro 1).

Aproximadamente, el 60% de los ovocitos vitrificados fueron considerados como viables luego del descongelamiento. Estas tasas son inferiores a valores de 77-88% reportados para bovinos (Dinnyes *et al.*, 2000; Atabay *et al.*, 2004). Asimismo, Begin *et al.* (2003) reportaron 77% de ovocitos viables inmedia-

tamente después del descongelamiento, pero señalaron que el número de ovocitos degenerados aumentó en las dos horas siguientes al descongelamiento, llegando a una tasa de 57% de ovocitos viables al culminar el proceso de cultivo *in vitro*. En este estudio ocurrió algo similar con los ovocitos de alpaca luego del descongelamiento, por lo que se evaluó la supervivencia de ovocitos al término de la activación química; es decir, 4 horas después del descongelamiento de los ovocitos.

El 31.3% de ovocitos resultaron dañados luego de la exposición a las soluciones vitrificantes (Fig. 1a.). Estos resultados son contradictorios con aquellos en ovocitos de bovinos, donde se reporta un 6% de ovocitos dañados por exposición a las soluciones vitrificantes (Dinnyes *et al.*, 2000), lo que demostraría que los ovocitos de alpaca son más sensibles al efecto tóxico de etilenglicol. No obstante, se dispone de un reporte en cabras donde la frecuencia de ovocitos dañados fue similar a la del presente estudio (Begin *et al.*, 2003).

El presente estudio demuestra, además, que los ovocitos de alpaca posdescongelación son fisiológicamente viables al responder al estímulo de la activación química y ser capaces de segmentarse (Fig. 1b). No obstante, se obtuvo una relativa baja tasas de segmentación (39.9%) con ovocitos vitrificados en relación al 55% reportado en bovinos (Dinnyes *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2010) y el 57% re-

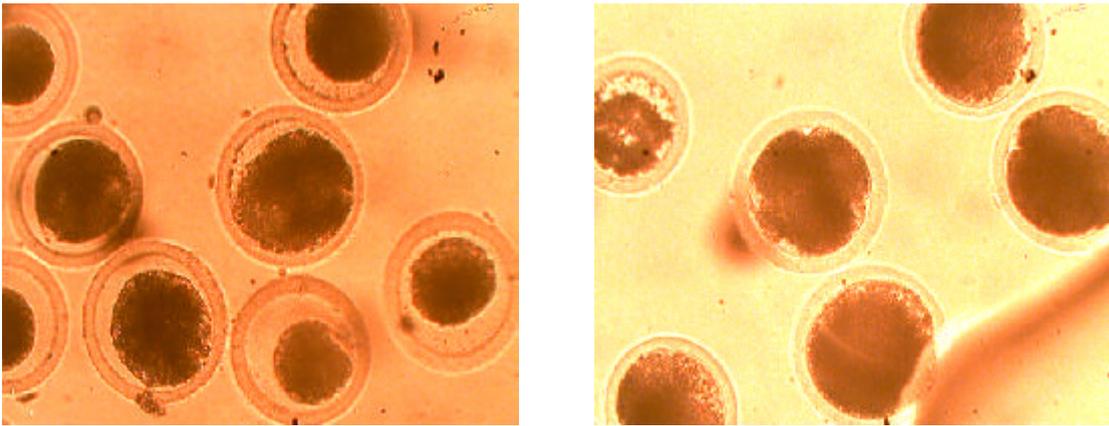


Figura 1. Ovocitos de alpaca vitrificados/descongelados. 1a. Ovocitos dañados por el proceso de vitrificación. 1b. Segmentación de ovocitos dos días después de la activación química.

portado en cabras (Begin *et al.*, 2003), aunque estas diferencias podrían ser explicadas por diferencias entre especies (Shaw *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009).

Los ovocitos de alpaca expuestos a las soluciones vitrificantes presentaron tasas de segmentación similares a los ovocitos no vitrificados, lo que indica que pese a que muchos ovocitos degeneran al exponerse en las soluciones de vitrificación, los sobrevivientes son capaces de segmentarse con la misma eficacia que los ovocitos no expuestos a las soluciones vitrificantes.

No se lograron obtener blastocistos a partir de ovocitos vitrificados y de ovocitos expuestos a las soluciones vitrificantes; sin embargo, Dinnyes *et al.* (2000) llegaron a obtener blastocistos bovinos de ovocitos vitrificados (11%) y de ovocitos expuestos a las soluciones crioprotectantes (25%), luego de la activación química. Estudios en otras especies demuestran una baja tasa de blastocistos obtenidos a partir de ovocitos vitrificados/descongelados con el método de superficie sólida [9% en cerdas, Somfai *et al.* (2007), 1% en ovinos, Zhang *et al.* (2009), y 0% en caprinos, Begin *et al.* (2003)], así como a partir de ovocitos expuestos a las soluciones vitrificantes [24% en porcinos,

Somfai *et al.* (2007) y 5% en cabras, Begin *et al.* (2003)].

Los resultados confirman la necesidad de realizar estudios adicionales sobre la aplicación del método de superficie sólida para mejorar las tasas de desarrollo embrionario a partir de ovocitos vitrificados (Gupta *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

- ? Es posible obtener ovocitos morfológicamente normales y fisiológicamente viables en la alpaca luego del proceso de vitrificación/descongelación por el método de superficie sólida.
- ? Los ovocitos de alpaca son sensibles a la exposición en etilenglicol.
- ? La criopreservación de ovocitos de alpaca afecta el futuro desarrollo de los embriones.

LITERATURA CITADA

1. **Albarracín J. 2005.** Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica de Open Pulled Straw: Estudio estructural

- de cromosomas, microtúbulos, y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario *in vitro*. Tesis doctoral. España: Universidad Autónoma de Barcelona. 133 p.
2. **Aller J, Rebuffi G, Cancino AK, Alberio RH. 2002.** Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos. *Anim Reprod Sci* 73: 121-127.
 3. **Atabay EC, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M, Koga A, Kanai Y. 2004.** Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer. *Theriogenology* 61: 15-23.
 4. **Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer C. 2003.** Cryopreservation of goat oocytes and *in vivo* derived 2-to-4 cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 59: 1839-1850.
 5. **Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. 2003.** Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing – a review article. *Mol Cell Endocrinol* 202: 101-107.
 6. **Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. 2000.** High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 63: 513-518.
 7. **Gupta M, Uhm SJ, Lee HT. 2007.** Cryopreservation of immature and *in vitro* matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology* 67: 238-248.
 8. **Lattanzi M, Santos C, Chaves MG, Miragaya MH, Capdevielle EF, Egey J, et al. 2002.** Cryopreservation of llama (*Lama glama*) embryos by slow freezing and vitrification. *Theriogenology* 57: 585 (Abstr).
 9. **Martínez-Díaz M, Gatica R, Correa JE, Eyestone W. 2007.** Gestaciones producidas con embriones bovinos clonados por transferencia nuclear. *Arch Med Vet* 39: 59-62.
 10. **Ruiz J, Correa J, Martínez M. 2010.** Vitrificación de ovocitos bovinos y su uso en el desarrollo partenogenético de embriones. *Arch Med Vet* 42: 79-83.
 11. **Ruiz J. 2009.** Vitrificación de ovocitos de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis doctoral. Valdivia: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile. 155 p.
 12. **Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams G. 2005.** *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology* 63: 2445-2457.
 13. **Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. 2000.** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and tissue. *Theriogenology* 53: 59-72.
 14. **Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani N, Farhudin M, Dinnyes A, Nagai T, Kikuchi K. 2007.** Developmental competence of *in vitro* fertilized porcine oocytes after *in vitro* maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Criobiology* 55: 115-126.
 15. **Takahashi Y, First NL. 1992.** *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37: 963-978.
 16. **Uribe R. 2008.** Criopreservación de embriones bovinos (*Bos taurus*) producidos *in vitro*, mediante vitrificación en superficie sólida (VSS). Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 97 p.
 17. **Zhang J, Nedambale TL, Yang M, Li J. 2009.** Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): Effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. *Anim Reprod Sci* 110: 46-55.