

## EFFECTOS EPIGENÉTICOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN Y LA CONSANGUINIDAD EN EL VACUNO LECHERO

D´Cruz, N.<sup>1</sup>, Cooney M.<sup>2</sup> y Holland, M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>CITA, Zaragoza, Aragón, España; <sup>2</sup>Monash University, Clayton, VIC, Australia; <sup>3</sup>University of Queensland, QLD, Australia. E-mail: [ntdcruz@ext.aragon.es](mailto:ntdcruz@ext.aragon.es)

### INTRODUCCIÓN

Aunque es bien sabido que la criopreservación puede conducir al daño del ADN y a la disminución de la motilidad del espermatozoide, recientemente se ha demostrado, tanto en el ratón como en humanos, que los cambios epigenéticos/anomalías se pueden pasar a las generaciones siguientes (efectos trans-generacionales). También se ha demostrado que ciertas tecnologías avanzadas de reproducción, tales como el cambio del medio ambiente en el cultivo in vitro o la realización de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (Maher, 2005), pueden aumentar el riesgo de alteraciones epigenéticas en el embrión. En particular, en el ratón, los animales producidos a partir de espermatozoides congelados han mostrado tasas de crecimiento anormal, expresión anormal de ciertos genes y defectos de comportamiento (Davies et al, 2004; Ecker et al, 2004.). Datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que la criopreservación de espermatozoides de ratón también puede conducir a cambios epigenéticos en un grupo de genes con expresión alelo-específica (genes con imprinting). Hasta la fecha, no se han publicado estudios epigenéticos en espermatozoides congelados en la especie bovina.

Nuestros datos preliminares también sugieren que ciertas cepas de ratones son más susceptibles a los daños producidos por la criopreservación, siendo las cepas consanguíneas (B6) más susceptibles que las no consanguíneas. Como la consanguinidad sufre un aumento anual progresivo en la industria lechera (Wiggans et al, 1995), esto supone un problema potencial para el ganado lechero, sobre todo en ciertas razas, tales como la Australian Jersey, que estarían en mayor riesgo que otras. Los datos generados por la investigación propuesta serán útiles en la promoción de estrategias de mejora genética que minimicen la endogamia para los ganaderos/productores. Según Mike Goddard (2005), la raza Australian Jersey tiene una consanguinidad cercana al 6%. En el mercado de los EE.UU. se considera que un 6,25% de consanguinidad puede producir una pérdida de ingresos netos de 150 USD durante la vida del animal y una pérdida de 513 libras de leche (232.7 kg) en la primera lactación (Cassel, 1999).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 6 toros (raza pura con ~6% de consanguinidad) y 7 toros de raza no pura y no consanguíneos. Se recogió semen fresco y criopreservado de cada toro consanguíneo, mientras que el semen congelado de los toros no consanguíneos fue adquirido a LIC (Nueva Zelanda; no hubo disponibilidad de semen fresco). Se obtuvieron oocitos bovinos de matadero (Pakenham, VIC, Australia), que fueron madurados in vitro (MIV) y fertilizados in vitro (FIV), utilizando las muestras de semen en dos días diferentes, siguiendo la metodología previamente descrita por Hefferenan et al. (2010). Los embriones se cultivaron durante 7 días (hasta el estadio de blastocisto) y luego se congelaron rápidamente hasta su uso para el análisis de expresión génica. Cada toro fue utilizado para producir al menos 45 blastocistos. El excedente de embriones fue utilizado para el análisis de microarrays (Agilent 4x44K bovine array) en el Australian Genome Research Facility (AGRF).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los toros consanguíneos se utilizaron con éxito para la recolección de semen y superaron los parámetros de control de calidad (basado en el sistema CASA) establecido en *Genetics Australia*. La Tabla 1 muestra los datos de cada toro, las tasas de desarrollo hasta

blastocisto, el número de embriones obtenidos para análisis de la expresión y el excedente de embriones usado para el análisis de microarrays en el Australian Genome Research Facility (AGRF).

En conclusión, nuestros datos preliminares en ratones sugieren que existen diferencias epigenéticas en la expresión de genes de embriones obtenidos usando semen criopreservado frente a utilizar semen fresco, y que estas diferencias están incrementadas en una cepa endogámica. Hemos recogido semen de toros endogámicos y exogámicos de razas lecheras y hemos realizado la fecundación in vitro para producir blastocistos de día 7. Hubo un mayor porcentaje de blastocistos producidos a partir de semen congelado de toros exogámicos (26,0%) que en los toros endogámicos (semen fresco, 21,3%; congelado, 20,9%,  $P < 0.05$  ambos). La expresión génica de estos embriones se encuentra actualmente en curso tanto mediante análisis de microarrays como por qPCR.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cassel, B. (1999). *Inbreeding in Dairy Cattle*. <http://www.thedairysite.com>

Davies, W., Smith, R.J., Kelsey, G., Wilkinson, L.S. (2004). *Gen Exper Patterns* 4: 741-7.

Ecker, D.J., Stein, P., Xu, Z., Williams, C.J., Kopf, G.S., Bilker, W.B., Abel, T., Schultz, R.M. 2004. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1595-1600.

Haile-Mariam, M., Bowman, P.J., Beard, K., Goddard, M.E. 2005. A method that predicts the genetic composition and inbreeding of the future Australian dairy herd. *Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics* 16: 302-305.

Heffernan, C., Whitley, P.A.F., Milionis, A., Verma, P.J., Holland, M.K., Jans, D.A., D'Cruz, N.T., 2010. Lineage-specific expression of heterochromatin protein 1 $\gamma$  in post-compaction, in vitro-produced bovine embryos. *Reprod Fert Develop* 22: 1022–1031.

Sutcliffe, A.G., Peters, C.J., Bowdin, S., Temple, K., Reardon, W., Wilson, L., Clayton-Smith, J., Brueton, L.A., Bannister, W., Maher, ER. 2006. *Hum Reprod* 21(4):1009-11.

Wiggans, R., VanRaden, P.M., Zuurbier, J. 1995. *J Dairy Sci* 78: 1584–1590.

**Tabla 1.** Tipo de semen, porcentaje y número total de blastocistos producidos por toro.

Toro	Grupo	Blastocistos (%)	Total Blastocistos	Blastocistos para Microarray
Endog. 1	Fresco	31,1	64	19
Endog. 1	Congelado	23,8	64	19
Endog. 2	Fresco	21,6	60	15
Endog. 2	Congelado	20,0	60	15
Endog. 3	Fresco	13,8	45	---
Endog. 3	Congelado	20,0	58	13
Endog. 4	Fresco	21,3	47	2
Endog. 4	Congelado	19,5	47	2
Endog. 5	Fresco	9,0	33	---
Endog. 5	Congelado	17,6	52	---
Endog. 6	Fresco	31,1	105	45
Endog. 6	Congelado	24,7	90	30
Exog. 1	Congelado	13,0	45	---
Exog. 2	Congelado	23,5	75	15
Exog. 3	Congelado	17,5	59	---
Exog. 4	Congelado	30,7	90	30
Exog. 5	Congelado	33,9	100	40
Exog. 6	Congelado	27,9	75	15
Exog. 7	Congelado	35,7	100	30

\*Endog. = endogámicos; Exog. = exogámicos

## EPIGENETIC EFFECTS OF CRYOPRESERVATION AND INBREEDING IN DAIRY CATTLE

**ABSTRACT:** It is well known that cryopreservation can lead to DNA damage and decreased sperm motility. Epigenetic changes/abnormalities have also recently been shown to be trans-generational. Certain advanced reproductive technologies can increase the risk of epigenetic abnormalities in the embryo, and preliminary data in our laboratory has shown that murine sperm cryopreservation can lead to changes in the expression of imprinted genes, with these changes possibly exacerbated in inbred strains. This is a potential problem for the Australian Dairy cattle industry, as inbreeding values are increasing yearly in several breeds, such as Australian Jersey cattle (Wiggans et al., 1997). The current research described here may be useful in promoting breeding strategies that minimize inbreeding by farmers. 6 inbred and 7 outbred bulls were evaluated. All fresh semen successfully passed quality control parameters established at Genetics Australia. Both fresh and frozen semen was used for in vitro fertilization and blastocyst rates recorded. In general, there was a higher percentage of blastocysts produced from frozen semen in outbred bulls (avg. 26.0%) than in inbred bulls (avg. fresh 21.3% and avg. frozen 20.9%). All blastocysts were frozen and gene expression analysis of these embryos is currently in progress by both microarray analysis and qPCR.

**Keywords:** epigenetics, embryo, cattle, inbreeding.