

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA



Tesis Profesional

**Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico**

**“Determinación del efecto del envejecimiento en los mecanismos de
reparación del genoma en las células germinales masculinas”**

Bastían Gonzalo Guzmán Soto

DIRECTOR/A DE TESIS: Marcia Manterola Zúñiga, PhD
Programa de Genética Humana, ICBM
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Viernes 15 de diciembre de 2023

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**



Tesis Profesional

**Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico**

**“Determinación del efecto del envejecimiento en los mecanismos de
reparación del genoma en las células germinales masculinas”**

Bastían Gonzalo Guzmán Soto

**DIRECTOR/A DE TESIS: Marcia Manterola Zúñiga, PhD
Programa de Genética Humana, ICBM
Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

Firmas

Viernes 15 de diciembre de 2023

Santiago, 12 de enero de 2024

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

El Sr. **Bastían Gonzalo Guzmán Soto**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el decimo semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“Determinación del efecto del envejecimiento en los mecanismos de reparación del genoma en las células germinales masculinas”**, dirigida por la **Dra. Marcia Manterola Zúñiga**, académica Programa de Genética Humana, del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por: la **Dra. Nevenka Juretic**, académica del Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y el **Dr. Pablo Cruz**, profesor del Departamento de Tecnología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La calificación obtenida se detalla a continuación:

Corrector 1 Dra. Nevenka Juretic	6.94	25%
Corrector 2	6.28	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	7.00	25%
Nota final tutor	7.00	25%
Nota final tesis profesional	6.81	

En consecuencia el estudiante **Bastían Gonzalo Guzmán Soto** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Prof. Marioly Müller.
Coordinador(a) curso
Trabajo de Investigación



HERNAN RODRIGO
TORRES RIVERA
15.932.579-2
16/01/2024 - 16:52
ESTE DOCUMENTO CONTIENE FIRMA ELECTRONICA AVANZADA
<https://veropapel.uchile.cl/validacion/verificador>
Cv: 3n8rcw34eob7a0d8e6b3mf4qy

Prof. Hernán Torres.
PEC curso
Trabajo de Investigación

Índice

Resumen	01
Abstract	02
Introducción	03
Hipótesis	08
Objetivos	08
Materiales y métodos	09
Resultados	12
Discusión	23
Conclusión	25
Bibliografía	26
Anexos	28

Resumen

Con el paso de los años se ha visto una tendencia a posponer la paternidad, lo que se ha asociado a una serie de cambios que producen un efecto negativo en la fertilidad masculina y posibles problemas en la descendencia. El aumento de la edad masculina tiene una estrecha relación con un aumento del riesgo de fragmentación del DNA, aparición de mutaciones *de novo*, cambios en los perfiles de metilación y altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los espermatozoides, entre otros. En este sentido, el genoma de los espermatozoides es altamente vulnerable al estrés oxidativo producido durante el envejecimiento. Recientes resultados de nuestro laboratorio han evidenciado que también el genoma de espermatocitos y espermátidas es afectado por el envejecimiento y presenta múltiples sitios de ruptura de doble hebra del DNA. Esto es crítico ya que este daño ocurre en células que tienen una activa recombinación del DNA entre cromosomas homólogos durante la meiosis y una alta transcripción de genes cruciales para la gametogénesis y reprogramación embrionaria. Sin embargo, aún se desconoce si los mecanismos de reparación del DNA en la meiosis son afectados por el envejecimiento masculino. En este proyecto planteamos que los mecanismos de reparación del genoma de las células germinales masculinas están alterados durante el envejecimiento, lo que lleva a una acumulación de daño genómico, específicamente rupturas de doble hebra del DNA (DSBs) que se producen durante la meiosis.

En este trabajo, mediante inmunofluorescencia se detectó que el envejecimiento genera un aumento significativo de autosomas con señal de Rad51, siendo esto un indicador de que en estas etapas existe un aumento de DSBs con el envejecimiento. Asimismo, se evidenció que con el aumento de la edad se genera un aumento de foci de ATR en los autosomas, mientras que para la proteína 53BP1 no se observaron cambios, lo que significaría que la reparación de estas DSBs que aparecen con la edad mantiene a la recombinación homóloga como la principal vía de reparación en un comienzo. Además, se demostró que, pese a que existe un aumento de daño, estos no son suficientes para gatillar o activar las proteínas de checkpoint como lo es CHK1.

Palabras claves

Envejecimiento, Rupturas de doble hebra del ADN, Reparación del ADN, Profase I, Meiosis.

Abstract

Over the years there have been a tendency to postpone parenthood, which has been associated to several changes such as male infertility and possible problems in the offspring's health. Male aging is closely related to increased levels in oxidative stress in the sperm and genome instability due to DNA fragmentation, de novo mutations and changes in methylation profiles. In the same way, recent results from our laboratory have shown that the genome of spermatocytes and spermatids is also affected by aging and exhibit multiple DNA breakage sites. This is critical since this damage occurs in cells that have an active DNA recombination between homologous chromosomes during meiosis and high transcription of genes crucial for gametogenesis and embryonic reprogramming. However, the effect of aging in the DNA repair mechanisms during meiosis is still unknown. In this project we propose that the repair mechanisms of the male germ cell genome are altered during aging, leading to an accumulation of genomic damage, specifically DNA double-strand breaks (DSBs) that occur during meiosis.

In this work, through immunofluorescence it was detected that aging generates a significant increase in autosomes with a Rad51 signal, this being an indicator that in these stages there is an increase in DSBs with aging. Likewise, it was evident that with increasing age an increase in ATR foci is generated in the autosomes, while no changes were observed for the 53BP1 protein, which would mean that the repair of these DSBs that appear with age maintains Homologous recombination as the main repair pathway. Furthermore, it was shown that, although there is an increase in damage, these are not sufficient to activate checkpoint proteins such as CHK1.

Key words

Aging, DNA double-strand breaks, DNA repair, Prophase I, Meiosis.

Introducción

Con el paso de los años se ha observado una tendencia a posponer la paternidad hasta edades por sobre los 30 años, especialmente en países desarrollados y subdesarrollados. Esto ocurre por diversos factores como el aumento de la esperanza de vida (2), la necesidad y presión de enfocarse en la obtención de una carrera (3) y la disponibilidad de métodos anticonceptivos efectivos y tecnologías de reproducción asistida (3). En Estados Unidos por ejemplo, la edad paterna ha aumentado de 27,4 a 30,9 años entre 1970s y 2017 (4) y el número de nacidos vivos de padres mayores a 40 años ha aumentado 12,5% entre 2011 y 2015 (3). En el caso de Chile, se ha observado un fenómeno similar con un aumento de 3,2% de los nacidos vivos de padres de entre 35 y 44 años entre 2017 y 2020 (5).

El aumento de la edad paterna al momento del embarazo implica riesgos y problemas como un mayor riesgo de abortos espontáneos, nacimientos prematuros, aumento de la mortalidad infantil (3), entre otros. Del mismo modo, la edad paterna avanzada (≥ 40 años) (advanced paternal age, APA) se asocia a una serie de cambios en los parámetros y calidad del semen provocando una disminución del volumen seminal, del recuento total de espermatozoides y de la motilidad, así como también aumento de espermatozoides morfológicamente anormales (2). En los espermatozoides de individuos APA ocurren además cambios extensos en los perfiles de metilación del DNA en sitios CpG (6), un aumento de fragmentación del DNA y mayor frecuencia de aparición de mutaciones *de novo* (4, 7, 8). Asimismo, hay pérdida de células germinales que se sustentan en el nicho de espermatogonias (stem cells) y una reducción del número de células de Leydig y Sertoli producto del envejecimiento testicular (9). Como consecuencia de todos estos cambios se ha observado un mayor riesgo de sufrir problemas reproductivos como infertilidad y abortos espontáneos (7).

Sumado a los efectos negativos producidos en la salud reproductiva, existe una relación directa entre APA y el desarrollo de desórdenes genéticos como acondroplasia y síndrome de Crouzon/Pfeiffer (2), y desórdenes psiquiátricos, principalmente esquizofrenia y autismo (10). Esto ocurre en parte debido a las mutaciones observadas en los espermatozoides de hombres con APA y a la evasión de mecanismos de reparación del ovocito que actúan luego de la fertilización por un espermatozoide con el DNA dañado, lo cual puede perdurar en la descendencia (2, 11).

Estrés oxidativo durante el envejecimiento, estabilidad genómica y efecto en la línea germinal masculina

Los espermatozoides requieren de especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS) para su correcto funcionamiento celular y para la fertilización (12). Sin embargo, en la línea germinal masculina, debido a la disfunción mitocondrial que se produce por el envejecimiento, APA está

relacionado con sistemas antioxidantes deficientes y mayores niveles intracelulares de agentes oxidantes como radicales libres, que son la principal fuente de producción de otras ROS (3). Por lo tanto, el envejecimiento trae como resultado una condición de estrés oxidativo que se ha relacionado con gametos de baja calidad y problemas de fertilidad (13, 14) , además de un aumento del daño del DNA que puede ser heredado a la descendencia (12). En este sentido, el envejecimiento masculino también se ha asociado a un incremento del número de mutaciones *de novo* (*de novo* mutations, DNMs) en la descendencia, contribuyendo significativamente en la aparición de enfermedades genéticas en los hijos de padres viejos. De hecho, existe todo un grupo de condiciones genéticas llamadas desordenes por efecto del envejecimiento paterno, como la acondroplasia o el síndrome de Couzon, que tienen una fuerte asociación con la edad paterna y la prevalencia de la enfermedad (15). Diferentes estudios han mostrado que errores en la replicación del DNA durante la mitosis de las espermatogonias sería uno de los principales contribuidores a la generación de DNM (16, 17). Sin embargo, las DNM producidas en las espermatogonias no explican todas las enfermedades genéticas que se asocian al envejecimiento masculino. Enfermedades complejas como esquizofrenia, autismo, esclerosis múltiple y diabetes tienen una alta prevalencia en hijos de padres APA (15). No está clara la causa de estos defectos, pero se postula que pueden tener origen en una combinación de factores genéticos (polimorfismos y DNMs), epigenéticos y ambientales como por ejemplo el aumento de ROS (18, 19). Estos factores tienen como punto común la generación de inestabilidad genómica producida por el envejecimiento, en donde daño en el DNA, DNMs y epimutaciones son acumuladas progresivamente con la edad (20). Importante, la desregulación de los mecanismos de reparación del DNA también asoma como potenciales responsables de la inestabilidad genómica observada en padres APA (21). Ejemplo de esto se observa al aumento de DNM debido a la acumulación de errores en los mecanismos de reparación del DNA del tipo mismatch repair, cuya función va disminuyendo con el envejecimiento asociándose a defectos teloméricos, acumulación de los errores replicativos e inestabilidad genómica (17).

Mecanismos de reparación frente a daño genómico en células germinales

La mantención de la integridad y estabilidad genómica es clave durante la espermatogénesis para la generación de gametos genética y epigenéticamente óptimos. Una etapa que es crucial en la espermatogénesis para la mantención de la estabilidad genómica es la meiosis, en donde ocurren diferentes vías de reparación y recombinación del DNA para generar variaciones genómicas en los gametos. La meiosis corresponde a una división celular a través de la cual se producen gametos haploides con solo una copia de cada cromosoma homólogo que, seguido de la fertilización, permite la

generación y restauración de organismos diploides (22). El éxito de la meiosis depende de eventos claves como el apareamiento, sinapsis, recombinación y segregación de los cromosomas homólogos, lo cual garantizan el éxito de la transmisión de información genética y epigenética a la descendencia (23). Durante la profase I de la meiosis I, se producen rupturas de doble hebra del DNA (DSBs) en sitios específicos del genoma necesarios para el reconocimiento de los cromosomas homólogos, que son luego reparados vía recombinación homóloga para asegurar la correcta segregación de los cromosomas homólogos. Exceso de DSBs gatillan vías de recombinación no homóloga para garantizar la integridad genómica del meiocito. Posteriormente, la formación del complejo sinaptonémico permite la reparación, recombinación y por consiguiente la correcta segregación de los cromosomas en la primera división meiótica (24-26).

Como se mencionó, la reparación de los DSBs se lleva a cabo mediante dos mecanismos. El principal de estos es la recombinación homóloga (HR), que favorece la recombinación entre cromosomas homólogos y promueve a su vez la formación de crossovers. Esta vía se compone por la participación de proteínas como ATM, ATR y γ H2AX que gatillan la activación de la cascada de reparación homóloga; el complejo MRN, EXO1 y BLM que participan en la resección de 5' a 3' del DNA en los sectores de la ruptura para la generación de DNA monocatenario (single strand DNA, ssDNA), y RPA que cubre estos sectores para proteger la región del DNA de la degradación (Figura 1).

Posteriormente RPA es reemplazado por las recombinasas RAD51 y DMC1, complejo que forma filamentos de nucleoproteínas que permiten la invasión del ssDNA al DNA doble hélice que se utilizará como molde para continuar con la reparación (27, 28) (Figura 1).

Otro mecanismo que actúa principalmente en las últimas etapas de la primera profase meiótica corresponde a la unión de extremos no homólogos (Non-homologous end joining, NHEJ), que tiene el potencial de reparar los DSBs al ligar los dos extremos sin el requisito de una secuencia homóloga. La maquinaria de esta vía está compuesta por diversos complejos como 53BP1, el MR(x), Ku y complejos de DNA ligasa, en el que los dos primeros se unen a los extremos de los DSBs para su unión y evitar su degradación, y reclutar el complejo de ligasa (Figura 1).

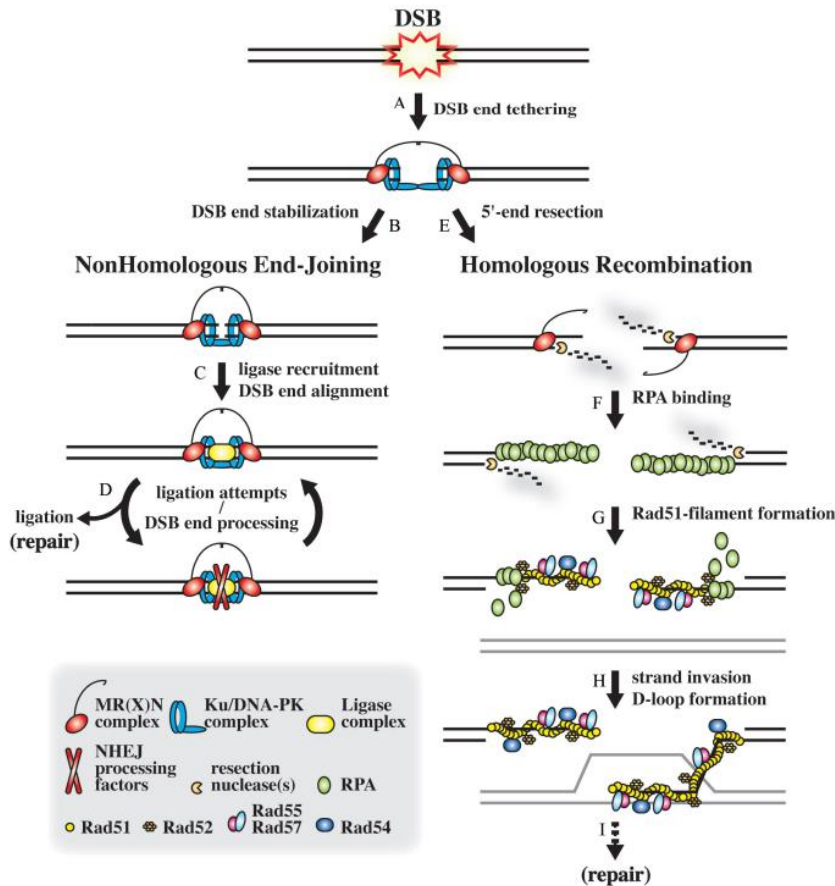


Figura 1. Modelo de reparación de DSBs por vías NHEJ y HR.

Tomado de Pardo et al. (1)

Pese a la gran cantidad de daño que sufre el DNA tanto de forma exógena como de forma endógena, la eficiencia de los mecanismos de reparación permite mantener la integridad genómica de la célula (20). En el caso de la meiosis, estos mecanismos permiten reparar los DSBs para asegurar la estabilidad genómica y la supervivencia celular (27). Sin embargo, en presencia de ROS y daño oxidativo del DNA, ocurre una regulación diferencial de las vías de reparación HR, NHR y escisión de bases (BER) durante la meiosis, mientras que podrían estar ocurriendo defectos en otros mecanismos y proteínas de reparación podrían también contribuir a aumentar el daño en el DNA causado por el estrés oxidativo (13).

Resultados recientes del laboratorio demostraron que el envejecimiento masculino se asocia a pérdida de la integridad y estabilidad genómica en espermatoцитos y espermátidas (29). De hecho, las rupturas de doble hebra que se producen aumentan conforme a la edad de los individuos, pero se mantienen bajo un umbral que no gatilla muerte celular. Por ende, este daño genómico puede ser transmitido durante la gametogénesis y heredado a la progenie (29). Estos resultados, en conjunto con

los antecedentes ya expuestos, permiten hipotetizar que durante el envejecimiento masculino la maquinaria de reparación del DNA que actúa durante la meiosis podría estar afectada, impactando en la estabilidad genómica de los espermatozoides.

Es bien sabido que el avance de la edad paterna es un factor crítico en la salud reproductiva como también en la posible aparición de enfermedades en la descendencia. Hasta la fecha se han logrado encontrar posibles explicaciones que se relacionan a la aparición de daño en el DNA en las etapas finales de la profase I de la meiosis, daño que posteriormente podría ser heredado a la descendencia. Sin embargo, se desconoce si el envejecimiento produce inestabilidad genómica debido a un deterioro en los sistemas de reparación del DNA que gatilla un aumento o persistencia del daño genómico. Continuar con las investigaciones en este campo es importante para la mejor comprensión de los eventos y mecanismos involucrados con el envejecimiento, dando así paso a posteriores estudios e investigaciones que puedan dar solución a esta problemática.

Hipótesis

El envejecimiento masculino impacta en los mecanismos de reparación del genoma de espermatocitos provocando acumulación de DSBs generados en la meiosis.

Objetivo General

Determinar el impacto del envejecimiento en los mecanismos de reparación del genoma en espermatocitos de ratón.

Objetivos Específicos

- Determinar el efecto del envejecimiento en la reparación de los DSBs durante la meiosis en espermatocitos de ratón.
- Determinar la dinámica de expresión, temporal y de localización de las vías de recombinación homóloga en la meiosis durante el envejecimiento en espermatocitos de ratón.
- Determinar la dinámica de expresión, temporal y de localización de las vías de recombinación no homóloga en la meiosis durante el envejecimiento en espermatocitos de ratón.

Materiales y Métodos

Muestras

Se utilizó un total de 9 ratones C57/BL6, de los cuales 3 corresponden a ratones control de 3 meses de edad y el resto corresponde a ratones viejos de 12 y 26 meses de edad. Los ratones fueron eutanasiados de acuerdo con lo descrito en el protocolo de bioética de animales #1050-1 (Anexo 1) y posteriormente se extrajeron los testículos para la realización de esparcidos de espermatozoides.

El manejo de los animales, la obtención de muestras y los procedimientos fueron realizados por la Dra. Marcia Manterola. Los esparcidos de espermatozoides a utilizar en este proyecto fueron obtenidos de ratones eutanasiados en noviembre del 2021 y almacenados en cajas libres de hielo a -80°C. La calidad de las muestras fue testada en cuanto a la inmunoreactividad de los esparcidos comparando los resultados con aquellos obtenidos en muestras nuevas. De esta forma, se aseguró la calidad de las inmunofluorescencias y la veracidad de los resultados conseguidos.

Esparcidos de espermatozoides

Para la realización de las técnicas de inmunofluorescencia se utilizaron esparcidos de espermatozoides, los cuales fueron preparados a partir de testículos de ratón a los que se les removió la túnica albugínea para aislar los túbulos seminíferos que posteriormente fueron cortados con la ayuda de un bisturí. A partir de estos se generó una solución homogénea a través de la disgregación mecánica con el uso de dos pinzas. Posteriormente se agregó entre 200 y 400 μ L de sacarosa 100 mM y se fue mezclando suavemente hasta obtener una solución de la que se tomaron 15 μ L para ser esparcidos en un portaobjetos limpio y previamente sumergido en una solución de Formaldehído al 2% (diluido en agua destilada) / tritón X-100 al 0,5%, a pH 7,5. Luego, los portaobjetos fueron secados por tres horas en una cámara húmeda y se lavaron 3 veces con Photo-Flo (Kodak) al 0,08% con la ayuda de una pipeta Pasteur, dejando los portaobjetos secar entre cada lavado. Finalmente, una vez secos, los esparcidos fueron guardados a -80°C hasta su uso.

Inmunofluorescencia

Para la determinación de la dinámica temporal y la localización de las proteínas de reparación de DSBs se utilizó inmunofluorescencia en los esparcidos de túbulos seminíferos. Para comenzar, los esparcidos fueron lavados en 2 cambios de PBS 1X. Luego se realizó la incubación con los anticuerpos primarios diluidos en PBS 1X en una cámara húmeda por toda la noche a 4°C

Anticuerpos primarios	Marca	Especie	Tipo	Dilución
Anti-Rad51 (Ab-1)	Millipore Sigma	Rabbit	Policlonal	1:30
Anti ATR (N-19) sc-1887	Santa Cruz	Goat	Policlonal	1:10
Anti phospho-Chk1 (Ser345) (133D3)	Cell signaling	Rabbit	Monoclonal	1:5
Anti 53BP1	abcam	Rabbit	Policlonal	1:1000
Anti-SYCP3 antibody	abcam	Mouse	Monoclonal	1:100

Una vez transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados con PBST 0,1% v/v y 3 lavados con PBS 1X de 20 minutos cada uno. Posteriormente se incubó con anticuerpo secundario 1:300 en cámara húmeda por toda la noche a 4°C seguido por 3 lavados con PBST 0,1% v/v y PBS 1X por 20 minutos cada uno, y se agrega DAPI por 3 minutos.

Anticuerpos secundarios	Marca	Especie	Tipo	Dilución
Alexa fluor 488-conjugated AffiniPure Anti-Goat	Jackson ImmunoResearch	Donkey	Policlonal	1:300
Alexa fluor 488-conjugated AffiniPure Anti-Rabbit	Jackson ImmunoResearch	Donkey	Policlonal	1:300
Alexa Fluor 594-conjugated AffiniPure Anti-Mouse	Jackson ImmunoResearch	Donkey	Policlonal	1:300

Finalmente se lava con PBS 1X y se monta con medio de montaje antidecoloración ProLong Gold (Invitrogen).

Definición de etapas de la profase I

Para la identificación de las distintas etapas y subetapas de la profase I, junto a cada proteína también se detectó SYCP3 que corresponde a la proteína del elemento axial del complejo sinaptonémico. Esto es posible debido a que con el avance de las etapas de la profase I los autosomas y cromosomas sexuales van sufriendo cambios morfológicos que son posibles de visualizar debido a la detección de esta proteína. Estos cambios corresponden a las variaciones del grosor de los autosomas, engrosamiento de extremos de autosomas, cambios en la conformación de los cromosomas sexuales, entre otros. También, la identificación de esta proteína se utilizó para comprobar la reactividad de las muestras utilizadas.

Análisis estadístico

La significancia estadística entre ratones de la misma edad se calculó mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de la prueba de Kruskal-Wallis con un valor significativo de $p < 0.05$. Los ratones fueron analizados por cada grupo etario y no se observaron diferencias significativas en cada grupo. Posteriormente se utilizó un test de Z para determinar las diferencias estadísticas entre los ratones de 3 meses de edad y los ratones de 26 meses de edad o un test de t no paramétrico de Mann Whitney dependiendo de los datos a analizar. El umbral de significancia se fijó en 0,05 con un intervalo de confianza del 95%.

Resultados

En células germinales masculinas, específicamente en espermatocitos, se ha observado un aumento de daño genómico asociado al envejecimiento, representado por un aumento de señal de H2AX en autosomas de etapas tardías de la profase I (29). Para determinar si el envejecimiento masculino tiene algún efecto sobre los mecanismos de reparación del genoma, en este trabajo se evaluó la presencia de proteínas que participan en la reparación de DSBs en modelos de ratones viejos. Se utilizaron esparcidos de espermatocitos de ratones viejos de 26 meses de edad, y esparcidos de ratones jóvenes de 3 meses de edad como control. En estos esparcidos se detectó mediante fluorescencia las proteínas de reparación del DNA de la vía de recombinación homóloga Rad51, ATR y CHK1, y de la vía de recombinación no homóloga 53BP1, que forman parte de la respuesta frente a la aparición de DSBs pero en distintas fases de la profase I.

Los esparcidos de espermatocitos de ratones viejos de 12 meses no presentaron resultados óptimos en cuanto a su calidad, lo que significó un bajo número de espermatocitos disponibles para su análisis, por lo tanto, estos no fueron incluidos en los resultados finales de esta tesis.

El envejecimiento produce un aumento de foci de Rad51 en espermatocitos en etapas tempranas de la profase I

Para determinar si el daño genómico presente en autosomas de espermatocitos viejos se debe a un aumento de DSBs en el genoma en etapas tempranas de la profase I, primero estudiamos la dinámica temporal de la localización de la recombinasa de DNA Rad51 en autosomas a lo largo de toda la profase I. Como se mencionó anteriormente, durante leptoteno se inducen cientos de cortes de doble hebra en el DNA que son luego reparados en zigoteno y paquiteno temprano por el complejo Rad51/Dmc1. Dado que este complejo media la reparación al unirse al DNA monohebra e inducir la invasión y recombinación del DNA (figura 1), cada foco de Rad51 que se forma en la profase I refleja la recombinación de cada sitio DSB en el DNA. Por ende, cada foco de Rad51 en un cromosoma permite estimar el número de DSBs presentes en el genoma.

De este modo, en ratones controles, durante zigoteno observamos que los foci de Rad51 están ampliamente distribuidos sobre los elementos laterales del complejo sinaptonémico de los autosomas que se comienzan a formar (Figura 2a, b, flechas), en concordancia con la reparación de los DSBs que ocurren en leptoteno. En zigoteno, observamos que el 100% de los espermatocitos presentan señal de

Rad51, con un promedio de $107,13 \pm 39,16$ ($n=15$) foci en zigoteno medio (Figura 3a) y $105,44 \pm 28,47$ ($n=25$) foci en zigoteno tardío (Figura 3b), lo cual es concordante con la literatura (30). Estos foci tienen un patrón puntiforme que se repite en el resto de los estadios. Con el avance de las etapas la cantidad de foci de Rad51 va disminuyendo, como se logra observar en paquiteno temprano (Figura 2c, flechas), en donde se siguen observando foci de Rad51 sobre el eje de los autosomas en el 100% de los espermatocitos, pero con un promedio de $23,92 \pm 9,68$ ($n=24$) foci por núcleo (Figura 3c). Cabe mencionar que a partir de esta etapa los cromosomas sexuales XY son ya distinguibles con SYCP3 y también presentan señal de Rad51 (Figura 2c, XY), sin embargo, no fueron considerados en el análisis de este trabajo. En paquiteno medio, el DNA de la mayoría de los autosomas se encuentra reparado y sólo hay $9,38 \pm 7,69$ ($n=74$) foci de Rad51 en 86,49% espermatocitos (Figura 3d). Esta reparación se completa hacia finales de profase I, en donde en paquiteno tardío, diploteno temprano, y diploteno medio/tardío, sólo un 20,34%, 7,41% y 8,89% respectivamente de espermatocitos presentan señal de Rad51, con un promedio de $0,42 \pm 0,95$ ($n=59$), $0,07 \pm 0,27$ ($n=27$) y $0,11 \pm 0,38$ ($n=45$) foci (Figura 3e-g) respectivamente. Estos resultados indican que la mayoría de los DSBs se reparan vía recombinación homóloga en estadios tempranos de la profase I, siendo muy escasos los focos que quedan en reparación hacia finales de paquiteno.

En los ratones de 26 meses, durante zigoteno medio y zigoteno tardío el 100% de los espermatocitos analizados presentan señal de Rad51. Sin embargo, encontramos que los foci de Rad51 aumentaron 1.57 veces más en zigoteno medio ($168,50 \pm 49,02$ ($n=8$)) y 1.86 veces más en zigoteno tardío ($196,23 \pm 54,49$ ($n=13$)), lo cual representa un incremento significativo de DSBs en comparación con espermatocitos controles en los mismos estadios (Figura 3a, b, $p < 0.05$ respectivamente). Este aumento también se observó en en paquiteno temprano, estadio donde el 100% de espermatocitos presentó $30,46 \pm 11,91$ ($n=35$) foci de Rad51 por núcleo, implicando un aumento significativo de 1.27 foci más que espermatocitos controles en el mismo estadio (Figura 3c, $p < 0.05$).

En paquiteno medio, encontramos que un 83,12% de los espermatocitos presentan foci de Rad51 con un promedio de $11,53 \pm 13,63$ ($n=77$) (Figura 3d), lo cual no difiere significativamente respecto del control. Este patrón se observa también hacia finales de profase I, en donde durante paquiteno tardío, diploteno temprano, y diploteno medio/tardío observamos un promedio de $0,35 \pm 0,71$ ($n=60$), $0,24 \pm 0,43$ ($n=34$) y $0,19 \pm 0,49$ ($n=69$) foci respectivamente por espermatocito (Figura 3e-g), valores muy similares respecto de espermatocitos controles en estos estadios.

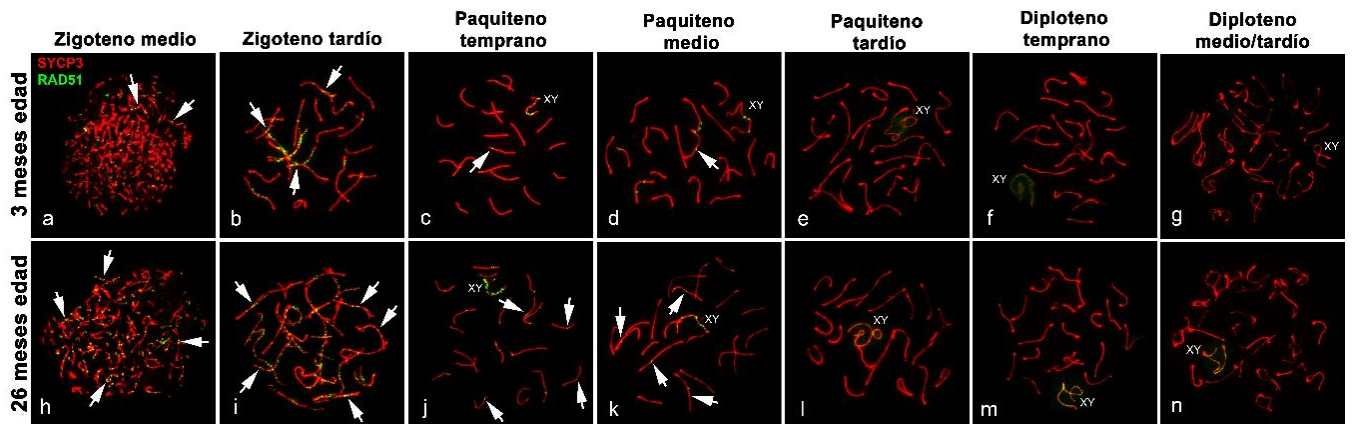


FIGURA 2. El envejecimiento altera la expresión de RAD51 en espermatocitos durante la profase I temprana. SYCP3 en rojo, RAD51 en verde. (a-g) Localización de RAD51 en espermatocitos durante los distintos estadios de la profase I en ratones de 3 meses de edad. (h-n) Localización de RAD51 en espermatocitos durante los distintos estadios de la profase I en ratones de 26 meses de edad. Un aumento del número de foci fue observado desde Zigoteno medio hasta Paquiteno temprano en ratones de 26 meses (flechas blancas).

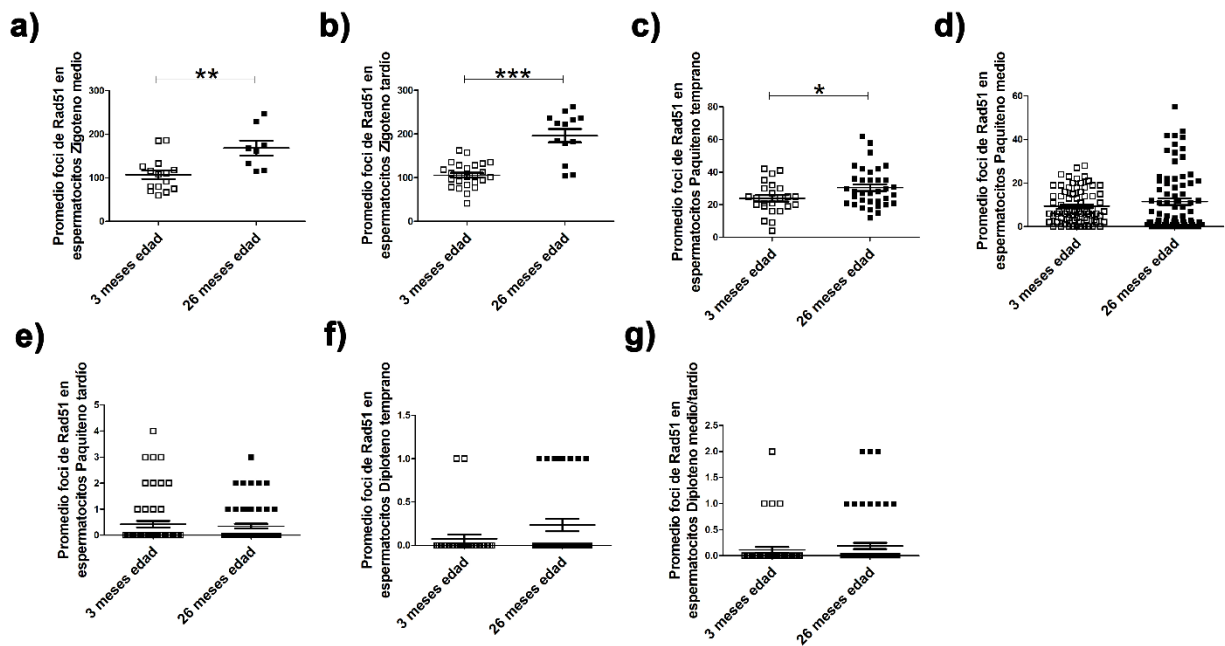


FIGURA 3. (a-g) Promedio de foci de RAD51 en espermatoцитos de ratones de 3 y 26 meses de edad en Zigoteno medio (a), Zigoteno tardío (b), Paquiteno temprano (c), Paquiteno medio (d), Paquiteno tardío (e), Diploteno temprano (f) y Diploteno medio/tardío (g). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ratones de una misma edad.

A pesar de que los promedios de los números de foci de Rad51 en espermatoцитos en estadios tardíos de la profase I fueron similares a los controles, encontramos que un alto número de núcleos tenían foci por sobre el promedio. Para determinar si estas poblaciones de espermatoцитos con foci de Rad51 eran significativamente mayores a los controles, se calculó por estadio el porcentaje de espermatoцитos que posee una cantidad de foci de Rad51 que supera el promedio normal tanto en ratones control de 3 meses, como también en los ratones de 26 meses y se aplicó una prueba z.

En este caso se encontró que los estadios temprano de la profase I, específicamente Zigoteno medio y Zigoteno tardío presentan variaciones estadísticamente significativas. En Zigoteno medio se observó que un 53% de los espermatoцитos presentan una cantidad de foci mayor al promedio en los ratones de 3 meses, mientras que en los ratones de 26 meses este valor aumenta a un 100% (Figura 4, $p < 0.05$). En Zigoteno tardío también se observa un aumento desde 44% en ratones control a 92% en ratones de 26 meses (Figura 4, $p < 0.05$). El resto de los estadios no presentan cambios significativos.

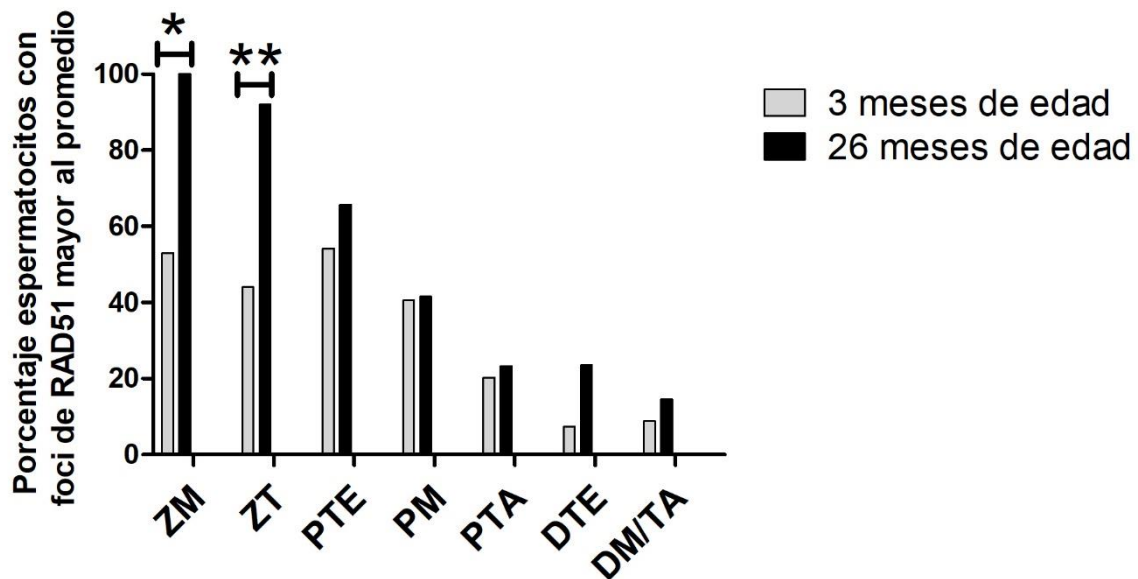


FIGURA 4. El envejecimiento se asocia a un alto número de espermatoцитos con mayor número de foci de Rad51 en relación al promedio de cada estadio de la profase I. Porcentaje de espermatoцитos con foci de RAD51 mayor al promedio en estadios de Zigoteno medio (ZM), Zigoteno tardío (ZT), Paquiteno temprano (PTE), Paquiteno medio (PM), Paquiteno tardío (PTA), Diploteno temprano (DTE) y Diploteno medio/tardío (DM/TA) de ratones de 3 y 26 meses de edad.

El envejecimiento produce un aumento de foci de ATR en los autosomas en estadios tempranos de la profase I

Para determinar si la regulación de la reparación de los DSBs que están en exceso en los autosomas de espermatoцитos viejos está mediada por la recombinación homóloga del DNA, estudiamos la dinámica temporal de localización de la kinasa ATR durante la profase I. Esta enzima es un regulador maestro de la recombinación del DNA durante la meiosis y participa en la activación de checkpoints para asegurar la correcta reparación de los DSBs que pueden persistir durante la profase I. En concordancia con lo reportado en la literatura, en ratones controles encontramos que ATR está presente durante zigoteno y paquiteno con un patrón puntiforme que se ubica sobre el eje de los cromosomas (Figura 5). Es así como en las etapas más tempranas de zigoteno medio y zigoteno tardío se presentan la mayor cantidad de foci con un 100% de espermatoцитos con señal en ambos estadios (Figura 5a, b) y con un promedio de $7,4 \pm 1,71$ ($n=10$) y $5,78 \pm 2,22$ ($n=10$) foci respectivamente (Figura 6a, b). En paquiteno temprano, medio y tardío se observa una disminución constante tanto del porcentaje de espermatoцитos con señal

para ATR desde 24,64% en temprano, 11,29% en medio, y finalmente 5,83% en paquiteno tardío (Figura 5c-e), como también una disminución del promedio de foci por célula, siendo estos $0,35 \pm 0,68$ (n=69), $0,18 \pm 0,57$ (n=124) y $0,06 \pm 0,24$ (n=103) respectivamente (Figura 6c-e). Finalmente, en las etapas de diploteno temprano y diploteno medio/tardío se mantiene un bajo número de foci por célula, con $0,11 \pm 0,38$ (n=53) en 9,43% de las células en el caso de diploteno temprano (Figura 5f, 6f), y $0,14 \pm 0,47$ (n=84) en 9,52% de las células en diploteno medio/tardío (Figura 5g, 6g).

En los espermatoцитos de ratones viejos observamos que durante zigoteno medio y al igual que en los controles, el 100% de núcleos presentaron señal de Rad51. Sin embargo, en este estadio encontramos un promedio de $9,33 \pm 2,12$ (n=9) foci, lo cual implica un aumento significativo de 1,26 veces mayor en comparación con espermatoцитos controles ($p < 0.05$) (Figura 5h, flechas; 6a). En Zigoteno tardío también se aprecia un aumento significativo de 1.95 veces más foci de Rad51 al comparar con los ratones control ($p < 0.05$), donde un 100% de espermatoцитos presentó un promedio de $11,33 \pm 5,14$ (n=12) foci por célula (Figura 5i, flechas; 6b).

En paquiteno temprano, medio y tardío se mantienen resultados similares a los controles, encontrando 17,31%, 14,29% y 6,25% espermatoцитos respectivamente con $0,23 \pm 0,55$ (n=52), $0,21 \pm 0,61$ (n=77) y $0,06 \pm 0,24$ (n=64) foci de ATR en paquiteno temprano, medio y tardío (Figura 5j-l; 6c-e). En Diploteno temprano se observa que un 10% de los espermatoцитos presentan un promedio de $0,10 \pm 0,30$ (n=40) foci. Finalmente, en Diploteno medio/tardío se obtuvo un 11,11% de espermatoцитos con un promedio de $0,15 \pm 0,45$ (n=54) foci (Figura 5m-n; 6f-g).

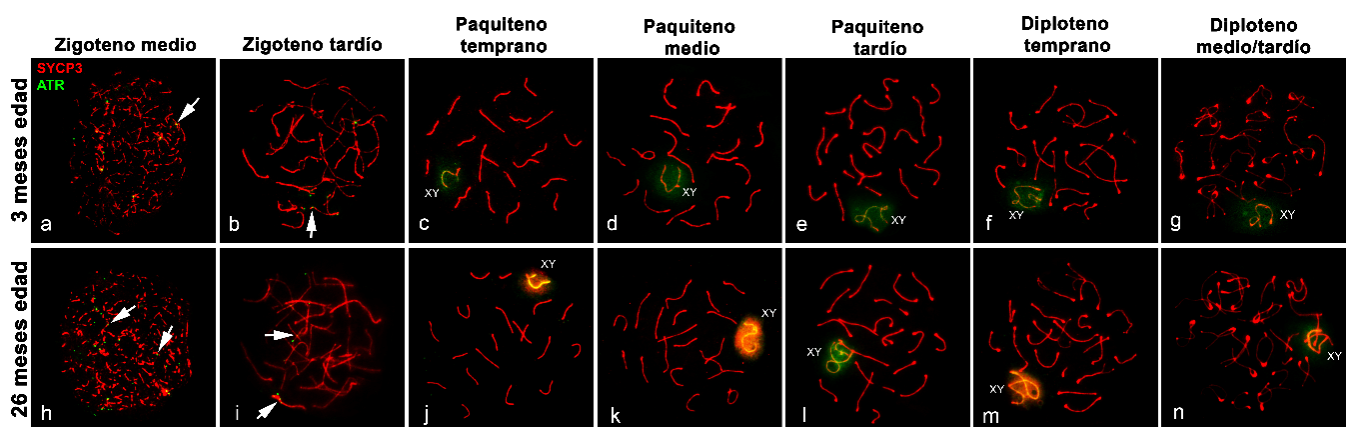


FIGURA 5. El envejecimiento altera la expresión de ATR en espermatoцитos durante la profase I temprana. SYCP3 en rojo, ATR en verde. (a-g) Localización de ATR en espermatoцитos durante los distintos estadios de la profase I en ratones de 3 meses de edad. (h-n) Localización de ATR en espermatoцитos durante los distintos estadios de la profase I en ratones de 26 meses de edad. Un

aumento del número de foci fue observado en Zigoteno medio y Zigoteno tardío en ratones de 26 meses (flechas blancas).

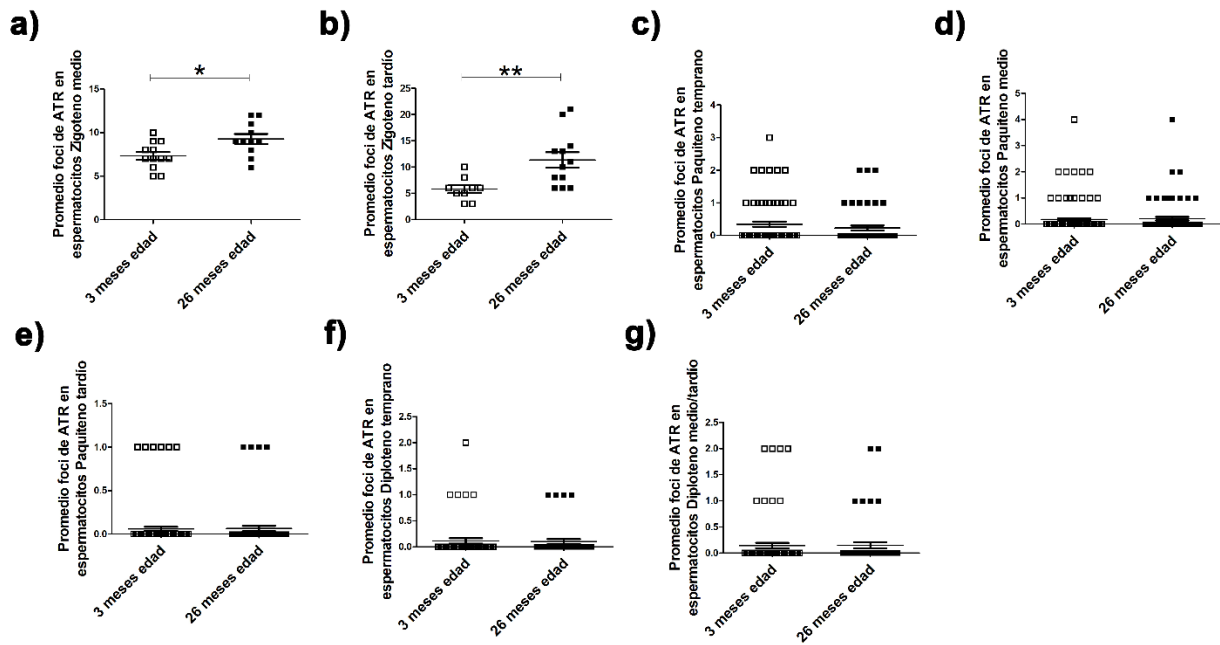


FIGURA 6. (a-g) Promedio de foci de ATR en espermatoцитos de ratones de 3 y 26 meses de edad en Zigoteno medio (a), Zigoteno tardío (b), Paquiteno temprano (c), Paquiteno medio (d), Paquiteno tardío (e), Diploteno temprano (f) y Diploteno medio/tardío (g). ** $p < 0.005$. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ratones de una misma edad.

Al igual que con Rad51, observamos también para ATR que una cantidad importante de espermatoцитos tenían foci de ATR por sobre el promedio de cada estadio. En este sentido y similar a la metodología usada para Rad51, se calculó para ratones de 3 y 26 meses el porcentaje de espermatoцитos con cantidad de foci de ATR mayor al promedio normal y se aplicó una prueba z.

Para ATR se obtuvieron resultados similares a los observado en Rad51, presentando cambios en los estadios tempranos de la profase I. En Zigoteno medio se evidenció un aumento de este porcentaje desde el 50% observado en los ratones control, a 77,78% en los ratones de 26 meses, sin embargo, este cambio no es significativo (FIGURA 7). En el caso de Zigoteno tardío, se obtuvo un aumento desde 50% a 100% (Figura 7, $p < 0.05$), lo que significa un aumento significativo de 2 veces mayor en los ratones viejos en comparación con los controles.

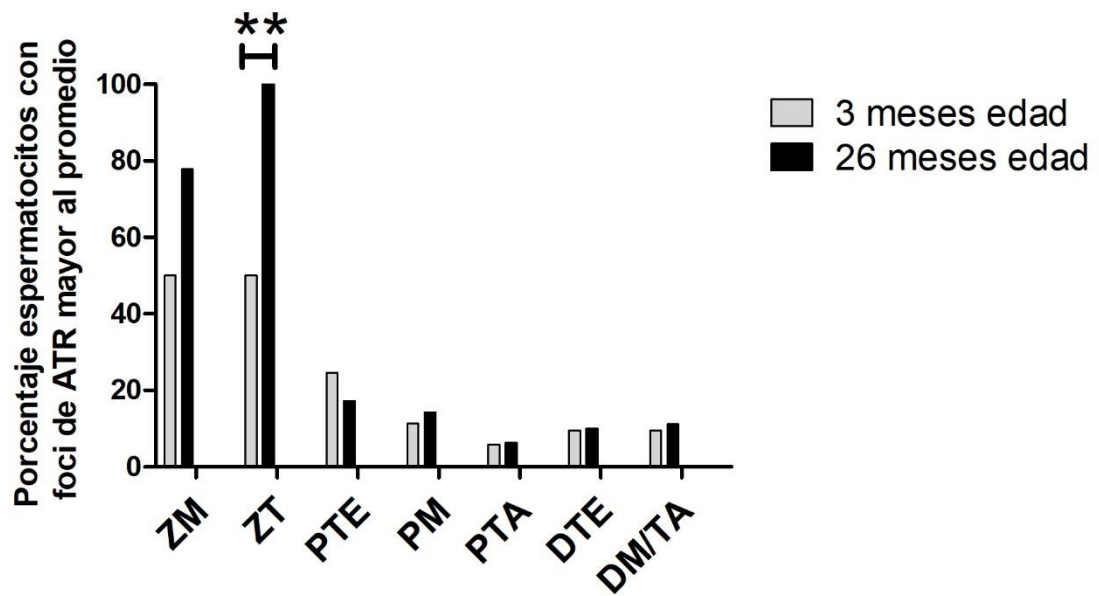


FIGURA 7. El envejecimiento produce un aumento de espermatocitos con un alto número de foci de ATR en relación al promedio de cada estadio de la profase I. Porcentaje de espermatocitos con foci de ATR mayor al promedio en estadios de Zigoteno medio (ZM), Zigoteno tardío (ZT), Paquiteno temprano (PTE), Paquiteno medio (PM), Paquiteno tardío (PTA), Diploteno temprano (DTE) y Diploteno medio/tardío (DM/TA) de ratones de 3 y 26 meses de edad.

El aumento de DSBs en autosomas en espermatoцитos viejos no gatilla activación de proteínas de checkpoint

Considerando que nuestros resultados muestran que el envejecimiento se asocia a un aumento significativo de DSBs en los autosomas de espermatoцитos en zigoteno y paquiteno temprano, y que gatillan las vías de reparación homóloga mediada por ATR y Rad51, nos preguntamos si estas rupturas podían gatillar la presencia de proteínas de checkpoint como Chk1. Para ello, detectamos con inmunofluorescencia la forma activa de Chk1, que corresponde a la fosforilación en la serina 345 de esta proteína (fosfo Chk1 o pChk1 por la sigla en inglés).

Encontramos que en ratones controles de 3 meses de edad, pChk1 se localiza principalmente como foci en los cromosomas sexuales XY (como parte del proceso del silenciamiento meiótico de los cromosomas sexuales) y en poca cantidad en los autosomas desde zigoteno medio hasta diploteno, manteniendo un bajo promedio de foci a lo largo de todos los estadios de la profase I (Figura 8a-g).

En zigoteno medio se obtuvo el mayor promedio de foci y porcentaje de espermatoцитos con señal, con un promedio de $0,63 \pm 1,54$ ($n=16$) (Figura 9a) foci y un porcentaje de 18,75%. En zigoteno tardío un 6,25% de los espermatoцитos presentaron un promedio de $0,06 \pm 0,25$ ($n=16$) (Figura 9b) foci y en el estadio de paquiteno temprano ($n=42$) no se obtuvieron señales positivas a pChk1 en autosomas (Figura 8c, 9c). Desde paquiteno medio a diploteno medio/tardío no se observaron grandes variaciones en el porcentaje de espermatoцитos con foci, siendo estos 2,17% en paquiteno medio, 2,99% en paquiteno tardío, 2,67% en diploteno temprano y 4,88% en diploteno medio/tardío. Los promedios de espermatoцитos con foci también mostraron una baja variación en estos estadios, con $0,02 \pm 0,15$ ($n=92$) en paquiteno medio, $0,03 \pm 0,17$ ($n=134$) en paquiteno tardío, $0,03 \pm 0,16$ ($n=75$) en diploteno temprano, y finalmente $0,07 \pm 0,34$ ($n=82$) en diploteno medio/tardío (Figura 9d-g).

En los ratones de 26 meses no se obtuvieron variaciones estadísticamente significativas. En zigoteno medio se tiene que un 25% de los espermatoцитos presentan foci, con un promedio de $0,5 \pm 1,07$ ($n=8$) (Figura 9a), mientras que en zigoteno tardío se evidencia un leve aumento que no es estadísticamente significativo, con un promedio de $4,56 \pm 13,67$ ($n=9$) (Figura 9b) foci en un 11,11% de los espermatoцитos. Desde paquiteno temprano hasta diploteno medio/tardío no se observan grandes variaciones en los resultados, con $0,05 \pm 0,23$ ($n=37$) y 5,41% en paquiteno temprano, $0,06 \pm 0,25$ ($n=79$) y 6,33% en paquiteno medio, $0,03 \pm 0,18$ ($n=86$) y 3,49% en paquiteno tardío, en el caso de diploteno temprano ($n=34$) no se encontraron señales positivas, y finalmente, $0,05 \pm 0,22$ ($n=95$) y 5,26% en diploteno medio/tardío (Figuras 9c-g).

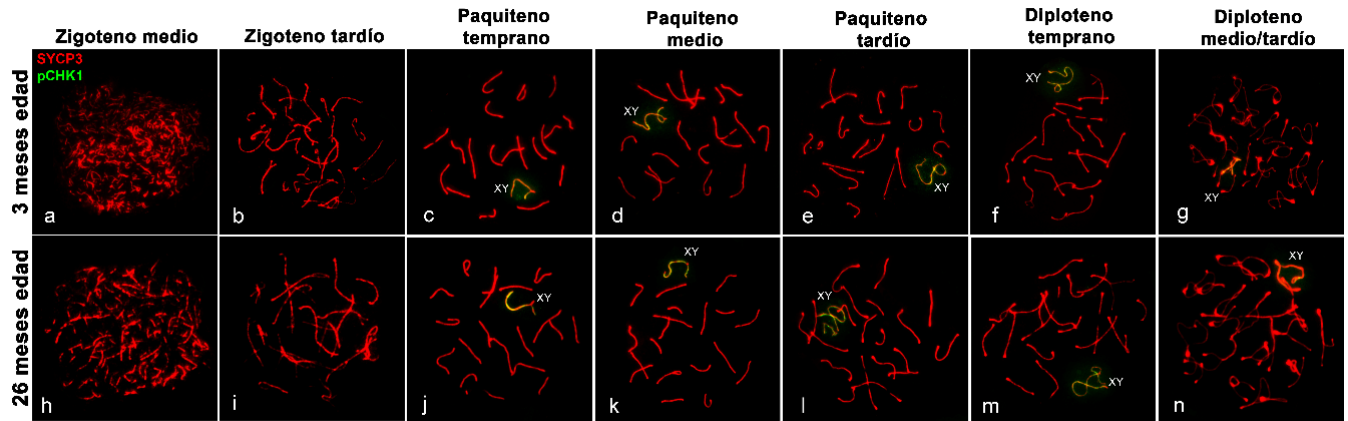


FIGURA 8. El envejecimiento no afecta la expresión o el patrón de localización de pCHK1 en espermatocitos. SYCP3 en rojo, pCHK1 en verde. (a-g) Localización de pCHK1 en espermatocitos durante los distintos estadios de la profase I en ratones de 3 meses de edad. (h-n) Localización de pCHK1 en espermatocitos durante los distintos estadios de la profase I en ratones de 26 meses de edad. No se observan foci de pCHK1 en autosomas de ratones de 26 meses, al igual que lo observado en los controles jóvenes. Hay presencia de señal en cromosomas XY desde Paquiteno temprano hasta Diploteno medio/tardío.

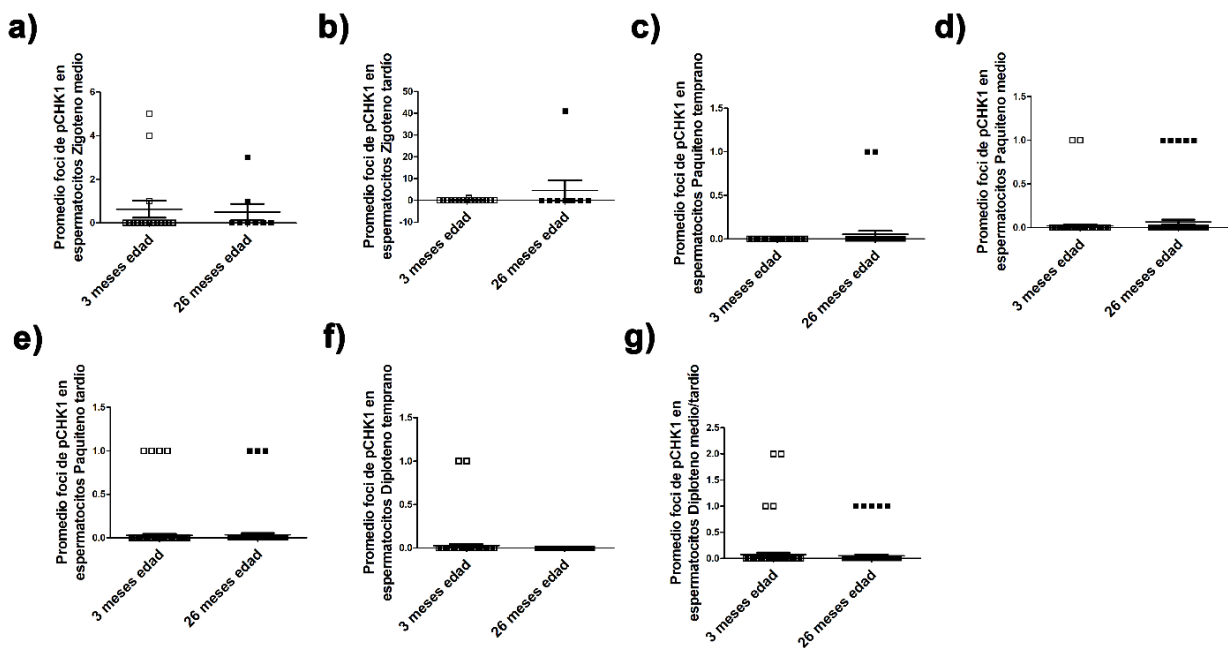


FIGURA 9. (a-g) Promedio de foci de pCHK1 en espermatocitos de ratones de 3 y 26 meses de edad en Zigoteno medio (a), Zigoteno tardío (b), Paquiteno temprano (c), Paquiteno medio (d), Paquiteno tardío (e), Diploteno temprano (f) y Diploteno medio/tardío (g). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ratones de una misma edad.

La reparación de los DSBs de autosomas producida por el envejecimiento no está mediada por la vía de recombinación no homologa dependiente de 53BP1

Finalmente, con el objetivo de evidenciar si la reparación de las DSBs sigue estando mediada por la recombinación homologa, o por el contrario es la vía NHEJ la responsable, se detectó mediante inmunofluorescencia la proteína 53BP1 que forma parte de los primeros pasos de la vía NHEJ haciendo que el DNA afectado sea reparado por esta vía.

En el caso de los ratones de 3 meses de edad, en los estadios de zigoteno medio (n=16), zigoteno tardío (n=17) y paquiteno temprano (n=34) no se observó señal en toda la extensión del núcleo (Figura 10a-c). En paquiteno medio (n=74), paquiteno tardío (n=44), diploteno temprano (n=41) y diploteno medio/tardío (n=75) se observó señal únicamente en los cromosomas XY con distinta intensidad, pero no se obtuvieron foci de 53BP1 en los autosomas (Figura 10d-g).

En ratones de 26 meses no se evidenciaron cambios, con un promedio de 0 foci en los estadios de zigoteno medio (n=4), zigoteno tardío (n=4) y paquiteno temprano (n=11) (Figura 10h-j), mientras que en paquiteno medio (n=29), paquiteno tardío (n=25), diploteno temprano (n=20) y diploteno medio/tardío (n=34) la señal es exclusiva de los cromosomas XY (Figura 10k-n).

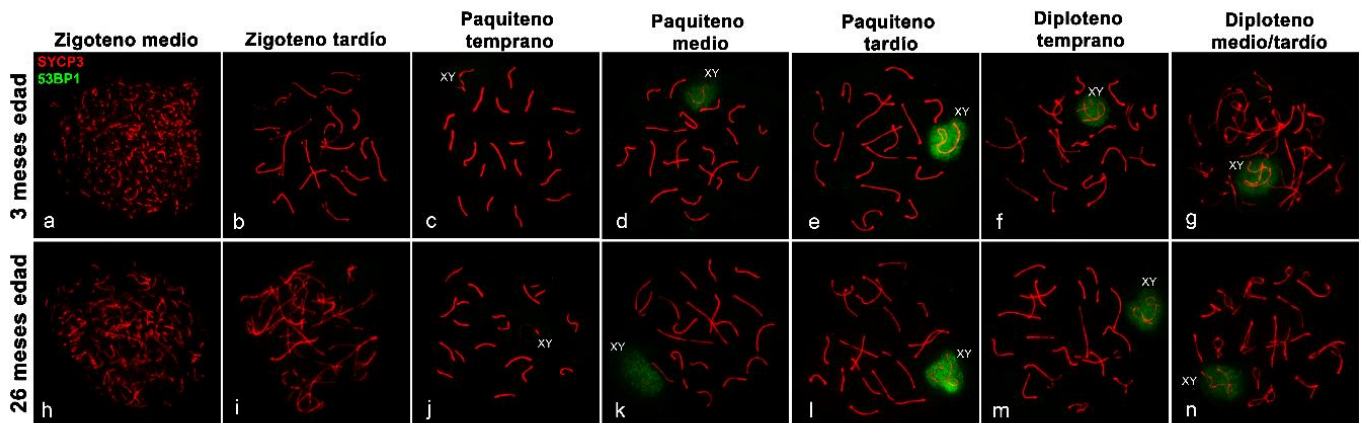


FIGURA 10. El envejecimiento no afecta la expresión o el patrón de localización de 53BP1 en espermatoцитos. SYCP3 en rojo, 53BP1 en verde. (a-g) Localización de 53BP1 en espermatoцитos durante los distintos estadios de la profase I en ratones de 3 meses de edad. (h-n) Localización de 53BP1 en espermatoцитos durante los distintos estadios de la profase I en ratones de 26 meses de edad. No se observan foci de 53BP1 en autosomas de ratones de 26 meses, al igual que lo observado en los controles jóvenes, siendo la señal únicamente en cromosomas XY desde Paquiteno medio hasta Diploteno medio/tardío.

Discusión

En el presente estudio determinamos si el envejecimiento impacta en los mecanismos de reparación del genoma en espermatozoides. Se encontró que ciertas proteínas que participan en la reparación de DSBs en la profase I son sensibles al envejecimiento, como es el caso de RAD51 y ATR debido a que se encontró que, en etapas tempranas de la Profase I, Zigoteno medio, Zigoteno tardío y Paquiteno temprano en caso de RAD51, y Zigoteno medio y Zigoteno tardío en el caso de ATR, ocurre un aumento de la cantidad de foci de estas proteínas en los autosomas de ratones de 26 meses de edad. La causa de este aumento sigue siendo desconocida, pero es posible hipotetizar que se podría deber principalmente a un aumento en la cantidad de daño, específicamente aparición de DSBs *de novo* que gatillan los mecanismos de reparación.

Es importante considerar que estas variaciones en los mecanismos de reparación que se observan con la edad ocurren exclusivamente en la profase I temprana, y posteriormente, con el avance de los estadios se tienden a equilibrar los niveles de las proteínas, alcanzando niveles normales observados en ratones de 3 meses de edad. Por lo tanto, con esto surge la pregunta sobre si esto ocurre debido a la efectiva reparación de las DSBs o si, por otro lado, estas DSBs podrían superar un umbral que lleve finalmente a la apoptosis. Es por esto que es importante continuar con las investigaciones para dar respuesta a esta pregunta, pudiendo realizar, por ejemplo, estudios de apoptosis con caspasas o PARP.

Previos estudios sugirieron que existe una relación entre el aumento de la edad en machos con un aumento de autosomas con daño genómico en la profase I tardía (29), sin embargo, en este estudio logramos evidenciar que los cambios provocados a nivel de los mecanismos de reparación son más bien a nivel de la profase temprana. Esta diferencia en la temporalidad de los hallazgos podría estar explicada por una ineficiente reparación debido a un aumento de DSBs a niveles que los mecanismos de reparación no logran dar abasto y que, por lo tanto, el daño que normalmente se debería evidenciar únicamente en estadios más tempranos debido a su posterior reparación, se seguiría observando en estadios más avanzados.

Por otro lado, se encontró que hay otras proteínas que no sufren cambios en su expresión como consecuencia del envejecimiento masculino. Uno de estos casos es 53BP1, proteína encargada de proteger los extremos de DSBs de la resección que llevaría a una reparación por recombinación homóloga (HR), y por lo tanto, promueve la reparación por NHEJ (31). En este caso se observó que no hay cambios en la expresión, temporalidad o localización de esta proteína, por lo que se puede concluir que la principal vía de reparación en la profase I meiótica sigue siendo la HR en el envejecimiento, sin

una sobre activación de la vía NHEJ producto de la aparición de daño evidenciado en los estudios anteriores. Otra proteína que no sufrió cambios con el envejecimiento es CHK1, esta quinasa es un punto de control activado en caso de daño para retrasar la progresión del ciclo celular, además de controlar la reparación del DNA, estabilidad genómica y apoptosis (32). Es interesante observar que no se identificaron cambios en su expresión, temporalidad o localización, lo que podría significar que, pese a que se identificó daño genómico en estadios tardíos de la profase I de ratones viejos, este no es suficiente para generar una detención del ciclo celular o en un caso más drástico, causar la apoptosis de los espermatoцитos.

Una proteína que logramos identificar en el transcurso del estudio y que podría estar siendo afectada por el envejecimiento es RAD18. Esta proteína, en conjunto con la enzima HR6B, tiene un rol importante en la reparación de DSBs originadas durante la meiosis, específicamente rupturas que persisten hasta etapas más tardías de la profase I (33). Por lo tanto, la aparición de DSBs en la profase I demostrada en estudios anteriores podría estar explicada por cambios en la expresión o correcto funcionamiento de esta proteína. Es por esto que son necesarios estudios futuros sobre la expresión, temporalidad y localización de RAD18 en condiciones de envejecimiento.

Conclusiones

- El aumento de la edad en ratones macho produce un aumento de la cantidad de foci de RAD51 y ATR en autosomas de etapas tempranas de la profase I:
 - En ratones de 26 meses de edad se produce un aumento del promedio de foci de RAD51 por espermatocitos que afecta a los estadios de Zigoteno medio, Zigoteno tardío y Paquiteno temprano.
 - En ratones de 26 meses de edad se produce un aumento del promedio de foci de ATR por espermatocito en los estadios de Zigoteno medio y Zigoteno tardío.
 - En el caso de RAD51 existe un aumento del porcentaje de espermatocitos con foci mayor al promedio que afecta a los estadios de Zigoteno medio y tardío. Por otro lado, con ATR se observa que este aumento también es exclusivo de Zigoteno medio y tardío, pero es únicamente significativo en zigoteno tardío.
- La causa del aumento de foci de proteínas de los mecanismos de reparación del genoma se desconoce, pero se puede deber principalmente a una aparición de DSBs *de novo*.
- El envejecimiento no genera cambios en la localización, expresión o temporalidad de la proteína 53BP1, por lo que la vía NHEJ no sufre cambios en su actividad producto del envejecimiento.
- El envejecimiento masculino en ratones macho no produce cambios en la localización, expresión o temporalidad de la proteína CHK1 que actúa como punto de control y es responsable de la detención del ciclo celular, reparación del genoma y apoptosis.
- Existe un aumento en la cantidad de DSBs en etapas tempranas de la meiosis, específicamente en la profase I temprana, hecho que no gatilla la activación de proteínas de checkpoint como CHK1. También, se sugiere que su reparación en un comienzo está mediada por la vía de recombinación homóloga del DNA.

Bibliografía

1. Pardo B, Gomez-Gonzalez B, Aguilera A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(6):1039-56.
2. Rabaça A FC, Sa R. Aging of the Male Germline: Influence of Advanced Male Age on Reproductive Outcome. *Andrology.* 2016;5(1).
3. Nguyen-Powanda P, Robaire B. Oxidative Stress and Reproductive Function in the Aging Male. *Biology (Basel).* 2020;9(9).
4. Pohl E, Gromoll J, Wistuba J, Laurentino S. Healthy ageing and spermatogenesis. *Reproduction.* 2021;161(4):R89-R101.
5. Instituto Nacional de Estadísticas, Anuario de estadísticas vitales 2017-2020 [
6. Oluwayiose OA, Wu H, Saddiki H, Whitcomb BW, Balzer LB, Brandon N, et al. Sperm DNA methylation mediates the association of male age on reproductive outcomes among couples undergoing infertility treatment. *Sci Rep.* 2021;11(1):3216.
7. Brandt JS, Cruz Ithier MA, Rosen T, Ashkinadze E. Advanced paternal age, infertility, and reproductive risks: A review of the literature. *Prenat Diagn.* 2019;39(2):81-7.
8. Gonzalez DC, Ory J, Blachman-Braun R, Nackeran S, Best JC, Ramasamy R. Advanced Paternal Age and Sperm DNA Fragmentation: A Systematic Review. *World J Mens Health.* 2022;40(1):104-15.
9. Paul C, Robaire B. Ageing of the male germ line. *Nat Rev Urol.* 2013;10(4):227-34.
10. Frans E, MacCabe JH, Reichenberg A. Advancing paternal age and psychiatric disorders. *World Psychiatry.* 2015;14(1):91-3.
11. Marchetti F, Bishop J, Gingerich J, Wyrobek AJ. Meiotic interstrand DNA damage escapes paternal repair and causes chromosomal aberrations in the zygote by maternal misrepair. *Sci Rep.* 2015;5:7689.
12. Nikitaras V, Zander-Fox D, McPherson NO. Improving Sperm Oxidative Stress and Embryo Quality in Advanced Paternal Age Using Idebenone In Vitro-A Proof-of-Concept Study. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(7).
13. Nguyen-Powanda P, Robaire B. Aging and oxidative stress alter DNA repair mechanisms in male germ cells of superoxide dismutase-1 null mice. *Biol Reprod.* 2021;105(4):944-57.
14. Sidler C. Chapter 29 - Genomic Instability and Aging: Causes and Consequences. In: Kovalchuk I, Kovalchuk O, editors. *Genome Stability.* Boston: Academic Press; 2016. p. 511-25.
15. Wood KA, Goriely A. The impact of paternal age on new mutations and disease in the next generation. *Fertil Steril.* 2022.
16. Goldmann JM, Veltman JA, Gilissen C. De Novo Mutations Reflect Development and Aging of the Human Germline. *Trends Genet.* 2019;35(11):828-39.
17. Yatsenko AN, Turek PJ. Reproductive genetics and the aging male. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(6):933-41.
18. Janecka M, Mill J, Basson MA, Goriely A, Spiers H, Reichenberg A, et al. Advanced paternal age effects in neurodevelopmental disorders-review of potential underlying mechanisms. *Transl Psychiatry.* 2017;7(1):e1019.
19. Taylor JL, Debost JPG, Morton SU, Wigdor EM, Heyne HO, Lal D, et al. Paternal-age-related de novo mutations and risk for five disorders. *Nat Commun.* 2019;10(1):3043.
20. Vijg J, Suh Y. Genome instability and aging. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:645-68.
21. Bermúdez-Cruz FAL-RaRM. The Role of DNA Repair in Cellular Aging Process: IntechOpen; 2019 June 5th, 2019. 232 p.
22. Hillers KJ, Jantsch V, Martinez-Perez E, Yanowitz JL. Meiosis. *WormBook.* 2017;2017:1-43.
23. Couteau F, Zetka M. DNA damage during meiosis induces chromatin remodeling and synaptonemal complex disassembly. *Dev Cell.* 2011;20(3):353-63.

24. Candi E, Melino G, Toth A, Dotsch V. Mechanisms of quality control differ in male and female germ cells. *Cell Death Differ.* 2021;28(7):2300-2.
25. Keeney S. Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. *Genome Dyn Stab.* 2008;2:81-123.
26. Page J, de la Fuente R, Manterola M, Parra MT, Viera A, Berrios S, et al. Inactivation or non-reactivation: what accounts better for the silence of sex chromosomes during mammalian male meiosis? *Chromosoma.* 2012;121(3):307-26.
27. Enguita-Marruedo A, Martin-Ruiz M, Garcia E, Gil-Fernandez A, Parra MT, Viera A, et al. Transition from a meiotic to a somatic-like DNA damage response during the pachytene stage in mouse meiosis. *PLoS Genet.* 2019;15(1):e1007439.
28. Shibata A, Jeggo P, Lobrich M. The pendulum of the Ku-Ku clock. *DNA Repair (Amst).* 2018;71:164-71.
29. Velasquez-Reyes K dIFR, Manterola M. . Aging impairs genome stability in meiotic and post-meiotic cells in male mice.
30. Carofiglio F, Inagaki A, de Vries S, Wassenaar E, Schoenmakers S, Vermeulen C, et al. SPO11-independent DNA repair foci and their role in meiotic silencing. *PLoS Genet.* 2013;9(6):e1003538.
31. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):7-18.
32. Huang M, Miao ZH, Zhu H, Cai YJ, Lu W, Ding J. Chk1 and Chk2 are differentially involved in homologous recombination repair and cell cycle arrest in response to DNA double-strand breaks induced by camptothecins. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(6):1440-9.
33. Inagaki A, Sleddens-Linkels E, Wassenaar E, Ooms M, van Cappellen WA, Hoeijmakers JH, et al. Meiotic functions of RAD18. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 16):2837-50.

Anexos

Anexo 1. Certificado aprobación comité bioética



Santiago, a 18 de diciembre de 2018

Certificado n°: **18217 – MED – UCH**

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **CBA-1050**, del Proyecto de Investigación titulado: **“Rol del lector epigenético Brdt en regular la estabilidad genómica mediante la formación y localización de los crossovers en meiosis”**, de la Investigadora Responsable Dra. **Marcia Manterola Zúñiga**, Profesor Asistente, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

La Investigadora se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **180** ratones *Brdt*^{-/-} y **114** ratones *WT*, provenientes de Columbia University Medical Center, New York, USA, desde diciembre de 2018 a diciembre de 2021, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Fondecyt de Iniciación Nro. 11181329**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.

Ronald Vargás Casanova
Director
CICUA – VID
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl

Anexo 2

Aprobación uso animales envejecidos bioética animales



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES

CERTIFICACIÓN

Este Comité certifica que las modificaciones solicitadas por la **Dra. Marcia Manterola** al Protocolo **CBA # 1050 FMUCH** han sido aprobadas, las cuales consisten en:

- El uso adicional de 24 ratones envejecidos de 17 meses y 24 ratones jóvenes de 2 meses.
- Agregar el procedimiento de administración de Vitaminas C y E por medio de inyección intraperitoneal.

Estas modificaciones no alteran ni contravienen las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales previamente aprobados (Protocolo CBA # 1050 FMUCH).



Dr. César Romero MV
Secretario

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales

Santiago, 13 de Agosto de 2020

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales
Facultad de Medicina - Universidad de Chile
Avda. Independencia 1027, Independencia 8380453, Santiago, Chile
Fono: 2 978 6923, Email: cba@med.uchile.cl