

**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**

**“Efecto del envejecimiento en la estabilidad genómica de los cromosomas sexuales  
X e Y durante la meiosis masculina de ratón”**

**Karina Andrea Bustamante Villalobos**

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la del director/a de tesis, Marcia Manterola Zúñiga.

Una firma manuscrita en tinta azul sobre un fondo gris, que parece ser la del estudiante, Karina Bustamante Villalobos.

**DIRECTOR/A DE TESIS: MARCIA MANTEROLA ZÚÑIGA, PhD**  
**Programa de Genética Humana, ICBM**  
**Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

**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**

**“Efecto del envejecimiento en la estabilidad genómica de los cromosomas sexuales  
X e Y durante la meiosis masculina de ratón”**

**Karina Andrea Bustamante Villalobos**

Una firma manuscrita en azul que se extiende desde la izquierda hacia la derecha, donde termina sobre un recuadro gris que contiene una versión digitalizada de la misma firma.

**DIRECTOR/A DE TESIS: MARCIA MANTEROLA ZÚÑIGA, PhD**  
**Programa de Genética Humana, ICBM**  
**Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

**18 de diciembre de 2023**

# ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>04</b>
<b>Introducción</b>	<b>06</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>11</b>
<b>Objetivos</b>	<b>11</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>12</b>
<b>Resultados</b>	<b>15</b>
<b>Discusión</b>	<b>26</b>
<b>Conclusión</b>	<b>28</b>
<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>29</b>
<b>Anexos</b>	<b>31</b>

## Resumen

El envejecimiento es un factor de riesgo para la fertilidad masculina y para la salud de su descendencia. La avanzada edad paterna (>35-40 años) se asocia a una disminución en la cantidad y calidad de espermatozoides, los que presentan defectos epigenéticos, fragmentación del DNA y mutaciones *de novo*, además de aumento del estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células germinales. Dentro de las células germinales, los espermatocitos son especialmente afectados por el envejecimiento y ROS. Durante la profase I, el aumento de ROS altera la actividad de proteínas de reparación y el envejecimiento masculino se asocia a daño genómico. En machos, los cromosomas X e Y imponen un desafío adicional ya que gatillan un proceso normal de reparación y condensación de la cromatina llamado inactivación meiótica de los cromosomas sexuales (MSCI). El MSCI es dirigido por una respuesta a daño en el DNA, actuando proteínas de las vías homólogas y no homólogas de reparación. Sin embargo, aún se desconoce si el envejecimiento afecta la reparación de los cromosomas X e Y y la formación del MSCI. En este trabajo se estudió el efecto del envejecimiento masculino en la estabilidad genómica de los cromosomas sexuales X e Y. Mediante inmunofluorescencia se detectó una serie de proteínas involucradas en la reparación de rupturas de doble hebra de DNA (DSBs), donde se detectó un aumento en los foci de Rad51 en los cromosomas sexuales, además de un aumento en la señal de ATR, lo que nos indica que existe un aumento de DSBs. De la misma manera, se observó un aumento de pCHK1 en etapas más tardías de profase I, lo que sugiere que los DSBs no están siendo reparados. Por otro lado, no existe diferencia para 53bp1, lo que indica que no hay cambios en la vía de recombinación no homóloga. Por último, se observó un cambio en la temporalidad de aparición de H3K27ac, lo que sugiere un daño causado por el envejecimiento en el proceso de establecimiento de MSCI. Estos resultados sugieren que existe un aumento en la fragmentación del DNA y posible daño en las vías de reparación de DSBs en los cromosomas sexuales, y sugiere una alteración transcripcional de los cromosomas X e Y durante la profase I.

### Palabras clave:

Envejecimiento, Fertilidad masculina, Meiosis, Reparación DNA, Silenciamiento cromosomas sexuales.

## **Abstract**

Male aging (>40 years) is associated with a decrease in the quantity and quality of spermatozoa, as well as epigenetic defects, DNA fragmentation, *de novo* mutations and increased reactive oxygen species (ROS) levels in the sperm. In somatic cells, aging and ROS produce DNA damage and decreased activity of DNA repair proteins, leading to genomic instability. Within germ cells, spermatocytes are especially affected by aging and ROS. During prophase I, the increase in ROS levels alters the activity of repair proteins, and results from our laboratory showed that male aging is associated with genomic damage. In males, the X and Y chromosomes pose an additional repair challenge, as they trigger a chromatin condensation and repair process called meiotic sex chromosome inactivation (MSCI). MSCI is driven by a response to DNA damage, driven by the homologous and non-homologous DNA damage repair pathways. However, it is still unknown how aging affects the repair of the X and Y chromosomes and the formation of the MSCI. In this work, the effect of male aging on the genomic stability of the X and Y sex chromosomes was studied. Using immunofluorescence, a series of proteins involved in the repair of double strand breaks (DSBs) were detected, where an increase in Rad51 foci was detected in the sex chromosomes, in addition to an increase in the ATR signal, which indicates that there is an increase in DSBs. Likewise, an increase in pCHK1 was observed in later stages of prophase I, which suggests that DSBs are not being repaired. On the other hand, there is no difference for 53bp1, which indicates that there are no changes in the non-homologous recombination pathway. Finally, a change in the timing of the appearance of H3K27ac was observed, suggesting damage caused by aging in the establishment process of MSCI. These results suggest that there is an increase in DNA fragmentation and possible damage in the DSB repair pathways, in the same way the repression of gene expression during prophase I would be affected.

**Key Words:** Aging; Male fertility; Meiosis; DNA repair; Sex chromosomes inactivation

## **Introducción**

En las últimas décadas se ha visto que hombres de países desarrollados y en vías de desarrollo están teniendo una tendencia a posponer la paternidad, debido a diversos factores como el trabajo, los estudios, entre otros [1]. En Estados Unidos se ha visto un aumento en la tasa de natalidad durante las últimas décadas de padres entre 35 a 39 años, 40 a 44 y 45 a 49 años en un 26%, 10,8% y 3,2% respectivamente [2]. En Chile se vive un escenario similar en lo que respecta a la mayor edad en los padres, donde los nacidos vivos de padres entre 35 y 44 años aumentó en un 3,2% en la última década [3]. El envejecimiento masculino y el aumento en la edad paterna (advanced paternal age, APA;  $\geq 35$ -40 años) pueden resultar en complicaciones en la salud reproductiva de los hombres y alteraciones metabólicas, de neurodesarrollo, o monogénicas en su descendencia. En los hombres se produce una disminución en los parámetros del semen y cambios en el número, morfología, movilidad y viabilidad de los espermatozoides [1]. También se asocia con fragmentación del DNA [4], cambios en el metiloma [5-7] y del transcriptoma de los espermatozoides [5, 8, 9]. En la descendencia aumenta la prevalencia de enfermedades como desordenes genéticos, enfermedades neuropsiquiátricas y anomalías congénitas [1].

El envejecimiento está ligado a una disminución de la eficiencia de los sistemas antioxidantes en las células y a elevados niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los espermatozoides. El efecto de ROS en el envejecimiento ha sido ampliamente demostrado en las células somáticas, en donde se van deteriorando funciones claves como acortamiento de los telómeros en los cromosomas, alteraciones epigenéticas e inestabilidad genómica [10], siendo esta última afectada por rupturas en el DNA y por daño en las proteínas que participan en vías de reparación de este [11, 12]. Lo que respecta a los espermatozoides, ocurre una disminución del recuento, la concentración y motilidad, resultando en una infertilidad masculina [13].

### **Meiosis masculina: importancia en la fertilidad de los individuos y en la salud de la descendencia.**

La meiosis es un tipo de división celular que produce gametos haploides a partir de células diploides, lo cual permite en organismos de reproducción sexual la formación de gametos haploides con variabilidad y estabilidad genética. Para ello, en la meiosis ocurren procesos claves como el apareamiento, la sinapsis y la recombinación entre los cromosomas

homólogos, y la transcripción de genes esenciales para la gametogénesis y la reprogramación fetal. Estos procesos permiten la correcta segregación de los cromosomas homólogos y la recombinación entre éstos, asegurando la fertilidad, generación de variabilidad genética en la descendencia y permiten las bases mecánicas de la herencia de los individuos. Errores en la meiosis producen infertilidad, abortos y desordenes congénitos [13].

En la meiosis, durante Profase I ocurren rupturas de doble hebra de DNA (DSBs) en sitios específicos del genoma llamados *hotspots* [14, 15]. Los DSBs gatillan la activación de las kinasas ATM y ATR que fosforilan a la histona H2AX en la serina 139 ( $\gamma$ H2AX) activando la vía de reparación homóloga del DNA, en donde participan proteínas como el complejo Nbs1-Mre11-Rad50, Brca1 y el complejo formado por las recombinasas Rad51-Dmc1 [16]. Para la correcta reparación de los DSBs, es clave la formación del complejo sinaptonémico (CS) y la sinapsis cromosómica [15, 16], lo cual provee una plataforma para la acción de las proteínas de la vía homóloga permitiendo la recombinación entre los cromosomas homólogos [17]. En la meiosis, cualquier daño que ocurra durante el proceso de reparación del DNA va a gatillar puntos de chequeo que conducen al espermatocito a muerte celular por apoptosis, lo que conlleva a una disminución en el número de espermátidas finales y así a la infertilidad del individuo [18].

### **Reparación de DSBs en los cromosomas X e Y: silenciamiento meiótico de cromosomas sexuales (MSCI).**

En las células germinales masculinas no sólo encontramos cromosomas homólogos, sino que también podemos hallar cromosomas heterólogos como es el caso de los cromosomas sexuales X e Y. Estos cromosomas presentan una pequeña región homóloga llamada región pseudo-autosómica (PAR) por la cual se sinaptan, mientras que el resto de la longitud de los cromosomas no forma CS y permanece en asinapsis. Debido a la ausencia de homología entre los cromosomas X e Y, los DSBs que se generan al comienzo de la profase I no son reparados de la misma forma que los autosomas y muestran una reparación tardía que gatilla una condensación e inactivación transcripcional, llamada inactivación meiótica de los cromosomas sexuales (MSCI) [19-21]. Cualquier alteración y/o interrupción en MSCI conlleva a defectos en la recombinación, en la sinapsis y en la

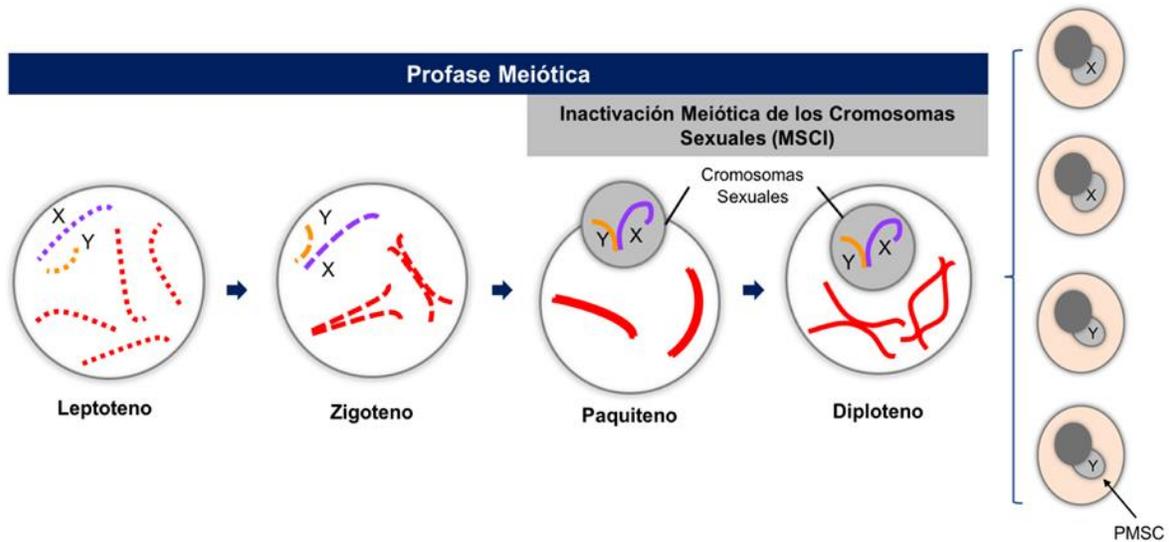
regulación de la meiosis y espermiogénesis, gatillando apoptosis de las células germinales [22].

La inactivación de los cromosomas sexuales y la formación del MSCI involucra cambios en la cromatina como la modificación de histonas, incorporación de variantes de histonas y reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina. La modificación de histonas incorpora marcas en la cromatina del cuerpo XY para dirigir señalizaciones de reparación del DNA e inactivación transcripcional, siendo la fosforilación de H2AX en la serina 139 ( $\gamma$ H2AX) una de las principales modificaciones de histonas que dirige la reparación de los DSBs y condensación de los cromosomas sexuales [23]. Otras modificaciones claves en estas vías son la monoubiquitinación de H2A, la trimetilación de H3 en la serina 9 (H3K9me3) y acetilación de H3 en la serina 27 [24-27].

La reparación tanto de los cromosomas homólogos (autosomas) como la del XY comienza en la etapa de zigoteno de la profase I al activarse la vía de reparación homóloga del DNA, mediada por ATM, ATR, complejo MRN, Brca1, RPA, Rad51 y Dmc1 [28]. Esta reparación también implica un remodelamiento de la cromatina, como la fosforilación en serina 139 de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX), que resulta vital para la correcta reparación del DNA y progresión meiótica [28]. Cuando se comienza a producir la sinapsis entre las regiones homólogas de los cromosomas, se comienzan a localizar en los sitios de DSBs las recombinasas Rad51 y Dmc1 que forman un complejo en la cromatina para reparar las rupturas, así como de la persistencia de cromatina remodelada por parte de  $\gamma$ H2AX [29].

Ya al comienzo de paquiteno, el complejo Rad51- Dmc1 ha reparado la mayoría de los DSBs de las regiones homólogas de los cromosomas. Sin embargo, en la región heteróloga de los cromosomas X e Y se gatilla una nueva vía de reparación en respuesta a la persistencia de rupturas del DNA que no son reparadas por Rad51 y Dmc1. Esto activa una nueva fosforilación de ATR, una nueva ronda de fosforilación de H2AX y la localización de Brca1 [30], lo cual comienza a formar el MSCI. La nueva ronda de fosforilación de H2AX sirve como sitio de unión en los cromosomas sexuales para la unión de Mdc1 y, posteriormente, de Rnf8 (ubiquitina E3 ligasa) [29] en paquiteno medio. Rnf8 junto a Rnf168 (ubiquitina ligasa) mono ubiquitinan la histona H2A (mono- ubiH2A), iniciando la activación de una cascada de vías de señalización dependientes de ubiquitina. Esto permite el reclutamiento de una serie de proteínas como Rad18 y 53BP1 que finalmente reparan los DSBs de las regiones heterólogas del XY [29]. La importancia de la correcta formación del MSCI impacta incluso a las espermátidas y espermatozoides, ya que las modificaciones de

la cromatina que ocurren en este proceso mantienen silenciados y marcados epigenéticamente a los cromosomas X e Y, lo cual perdura en etapas post meióticas de la espermatogénesis en un proceso conocido como silenciamiento post meiótico de los cromosomas sexuales (PMSCI) como se muestra en la figura 1.



**Figura 1 Formación y mantenimiento del MSCI durante la profase I.** Se observa la formación del complejo sinaptonémico en autosomas (rojo) y cromosomas X (morado) e Y (naranja), durante las etapas de la profase meiótica, la formación del MSCI y mantenimiento de la condensación de los cromosomas sexuales en espermátidas redondas (PMSC) (adaptado de Kato 2015) [31].

Posterior a la ubiquitinación por parte de Rnf8, se establece una cascada de modificaciones epigenéticas activas, esto promueve la expresión de genes de "escape" por medio de marcadores de potenciadores activos como la acetilación de H3K27 (H3K27ac). Para el establecimiento de H3K27ac en los cromosomas sexuales además de Rnf8, se requiere que exista una supresión de la mono ubiquitinación de H2A (H2AK119ub), lo cual ocurre por medio de la proteína SCML2, debido a que H2AK119ub inhibe el establecimiento de modificaciones epigenéticas activas [32].

### **Estabilidad genómica en el envejecimiento masculino ¿Se ven afectados los cromosomas sexuales X e Y?**

Como se mencionó, el envejecimiento masculino se asocia a un aumento en los niveles de ROS en el testículo y daño del DNA en los espermatozoides que puede ser transmitido a la

descendencia con consecuencias nocivas [33]. Resultados recientes del laboratorio evidenciaron también que el envejecimiento masculino se traduce en presencia de DSBs en autosomas durante la Profase I tardía, etapas en donde todo el DNA se encuentra reparado en estos cromosomas, lo que comprometería la estabilidad genómica de las células germinales y la gametogénesis [34]. Pero ¿esta inestabilidad genómica se produce sólo en los cromosomas autosómicos?, ¿qué ocurre en los cromosomas sexuales?, ¿este envejecimiento masculino estará presentando alteraciones en la formación y reparación de DSBs en los cromosomas sexuales X e Y durante la meiosis de ratón? En ovocitos, de meiosis femenina, se ve alterada la reparación del DNA mediada por ATM como consecuencia del envejecimiento, disminuyendo así la eficiencia de la reparación de DBSs [35]. Esto nos lleva a creer que existe un compromiso de la estabilidad genómica y de los mecanismos de reparación de los cromosomas sexuales X e Y en la meiosis masculina como consecuencia del envejecimiento

## **Hipótesis**

El envejecimiento masculino afecta la estabilidad genómica en los cromosomas sexuales X e Y durante la meiosis de ratón.

## **Objetivo general**

Determinar el efecto del envejecimiento masculino en la estabilidad genómica de los cromosomas sexuales X e Y durante la meiosis de ratón.

## **Objetivos específicos**

- Identificar la influencia del envejecimiento en la generación y/o reparación de DSBs en los cromosomas sexuales de espermatocitos de ratones.
- Analizar los mecanismos de reparación temprana de DSBs en cromosomas X e Y de espermatocitos de ratones viejos.
- Analizar los mecanismos de reparación tardía de DSBs en cromosomas X e Y de espermatocitos de ratones viejos.

## **Materiales y métodos**

### **Muestras de ratones**

Se utilizaron esparcidos de espermatozoides provenientes de 3 ratones C57/BL6 de 3 meses de edad para muestras control, y 3 ratones C57/BL6 de 26 meses de edad (ratones viejos) como grupo experimental, los cuales fueron eutanasiados de acuerdo con lo descrito en el protocolo de bioética de animales #1050-1 (Anexo 1). Los testículos fueron obtenidos y extraídos para realizar esparcidos de espermatozoides. Todo el manejo animal y 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 testeada 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**

Los esparcidos de espermatozoides fueron realizados extrayendo los testículos de los ratones y removiendo la túnica albugínea para obtener los túbulos seminíferos. Éstos fueron disectados utilizando un bisturí y posteriormente, disgregados mecánicamente con la utilización de dos pinzas hasta que los túbulos formaran una solución homogénea. Luego, se agregó entre 200 y 400  $\mu$ L de sacarosa 100 mM mezclando suavemente y de la solución se tomaron 15  $\mu$ L, esto fue esparcido 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. Posteriormente, los portaobjetos se colocaron en una cámara húmeda por tres horas hasta que estuvieron secos y se lavaron 3 veces con Photo-Flo (Kodak) al 0,08% usando una pipeta Pasteur y dejando los portaobjetos secar después de cada lavado. Una vez secos, los esparcidos fueron guardados a -80°C hasta su uso para este proyecto.

### **Inmunofluorescencia y análisis microscópico**

Para determinar si el envejecimiento produce daño genómico en espermatozoides (meiosis) se realizó inmunofluorescencia en los esparcidos de túbulos seminíferos, con el fin de identificar las proteínas de reparación de DSBs.

Los esparcidos de túbulos seminíferos fueron rehidratados por 10 minutos en PBS 1X; luego se realizó una incubación con anticuerpos primarios en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios:

- Rabbit anti-Rad51 1:30 (Millipore Sigma)
- Goat anti-ATR 1:10 (Sta Cruz BioTech)
- Rabbit anti-pChk1 1:5 (Cell signaling)
- Rabbit anti-53BP1 1:1000 (Abcam)
- Mouse anti-H3K27ac 1:1000 (Abcam)

Posteriormente, las muestras fueron lavadas en PBS-Tween 0.1% (3 veces por 20 minutos) y luego con PBS 1X (3 veces por 15 minutos) a temperatura ambiente para ser incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes en cámara húmeda toda la noche a 4°C (1:300), según especificidad y color deseado del anticuerpo primario:

- Donkey anti-goat IgG (H+L) conjugado con Alexa Fluor 488 1:300 (Jackson ImmunoResearch Laboratories).
- Donkey anti-rabbit IgG (H+L) conjugado con Alexa Fluor 488 1:300 (Jackson ImmunoResearch Laboratories).
- Donkey anti-mouse IgG (H+L) conjugado con Alexa Fluor 594 1:300 (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Finalmente, las preparaciones fueron lavadas como se describió previamente; teñidas con DAPI 0.5 µg/mL durante 3 minutos, lavadas en PBS 1X (3 veces por 10 minutos cada una, a temperatura ambiente), y montadas con ProLong antifade reagent (Invitrogen) para su preservación a 4°C.

Las observaciones se realizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 6400 y las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Infinity 3 Lumenera. Todas las imágenes se analizaron con Phothoshop CS8 e ImageJ (NIH).

### **Criterios para definir las etapas de la profase I, de acuerdo a la morfología del elemento axial de los cromosomas en los esparcidos de espermatocitos de ratón**

Las diferentes etapas de la profase I de la meiosis fueron identificadas mediante los cambios en la morfología de los autosomas y cromosomas sexuales con la proteína del elemento axial (EA) del complejo sinaptonémico SYCP3 (35). Estos cambios se enfocan en la aparición de excrecencias en el EA de cromosomas sexuales, el engrosamiento de los extremos de los cromosomas y el estado sináptico de autosomas y cromosomas sexuales en la región pseudoautosómica (PAR). En los estadios diploteno medio y tardío las

diferencias en el número de autosomas sinaptados y características del CS son poco precisas, por lo que se clasificaron como diploteno medio/tardío.

### **Análisis estadístico**

La significancia estadística entre ratones de la misma edad se determinó mediante el test ANOVA de una cola seguido de la post- prueba de Kruskal-Wallis con un valor significativo de  $p < 0.05$ . Se utilizó también un test de Z para determinar las diferencias estadísticas entre los ratones de cada grupo etario o un test de t no paramétrico de Mann Whitney dependiendo de los datos a analizar. El umbral de significancia fue de  $p < 0,05$  con un intervalo de confianza del 95%.

## Resultados

En células somáticas, se ha relacionado el proceso de envejecimiento con la pérdida de integridad genómica producto de un daño en el DNA. De la misma forma, se ha observado que en espermatozoides se puede hacer la misma asociación del envejecimiento con la fragmentación del DNA, lo que sugiere que el envejecimiento lleva a una pérdida de la integridad genómica en la línea germinal masculina.

Para determinar si se encuentra alterada la estabilidad genómica de las células germinales por causa del envejecimiento, se evaluó la influencia del envejecimiento en la generación, presencia y reparación de daño en el DNA de los cromosomas sexuales X e Y durante meiosis. Para esto, se evaluaron una serie de proteínas pertenecientes a la vía de reparación del DNA, por medio de inmunofluorescencia en modelos de ratones viejos de 26 meses de edad, equivalentes en edad a hombres entre ~36 y ~75 años de edad. Se utilizaron como control ratones de 3 meses de edad, los que corresponden a ~20 años de edad en hombres.

### **El envejecimiento aumenta los foci de Rad51 y altera el patrón de localización en los cromosomas sexuales XY.**

Se detectó con inmunofluorescencia a Rad51, recombinasa que media la invasión de las hebras de DNA y la reparación de los DSBs. Rad51 fue detectada en conjunto con SYCP3, proteína del elemento axial del complejo sinaptonémico (CS), permitiéndonos identificar los cromosomas sexuales y homólogos en los distintos estadios de Profase I.

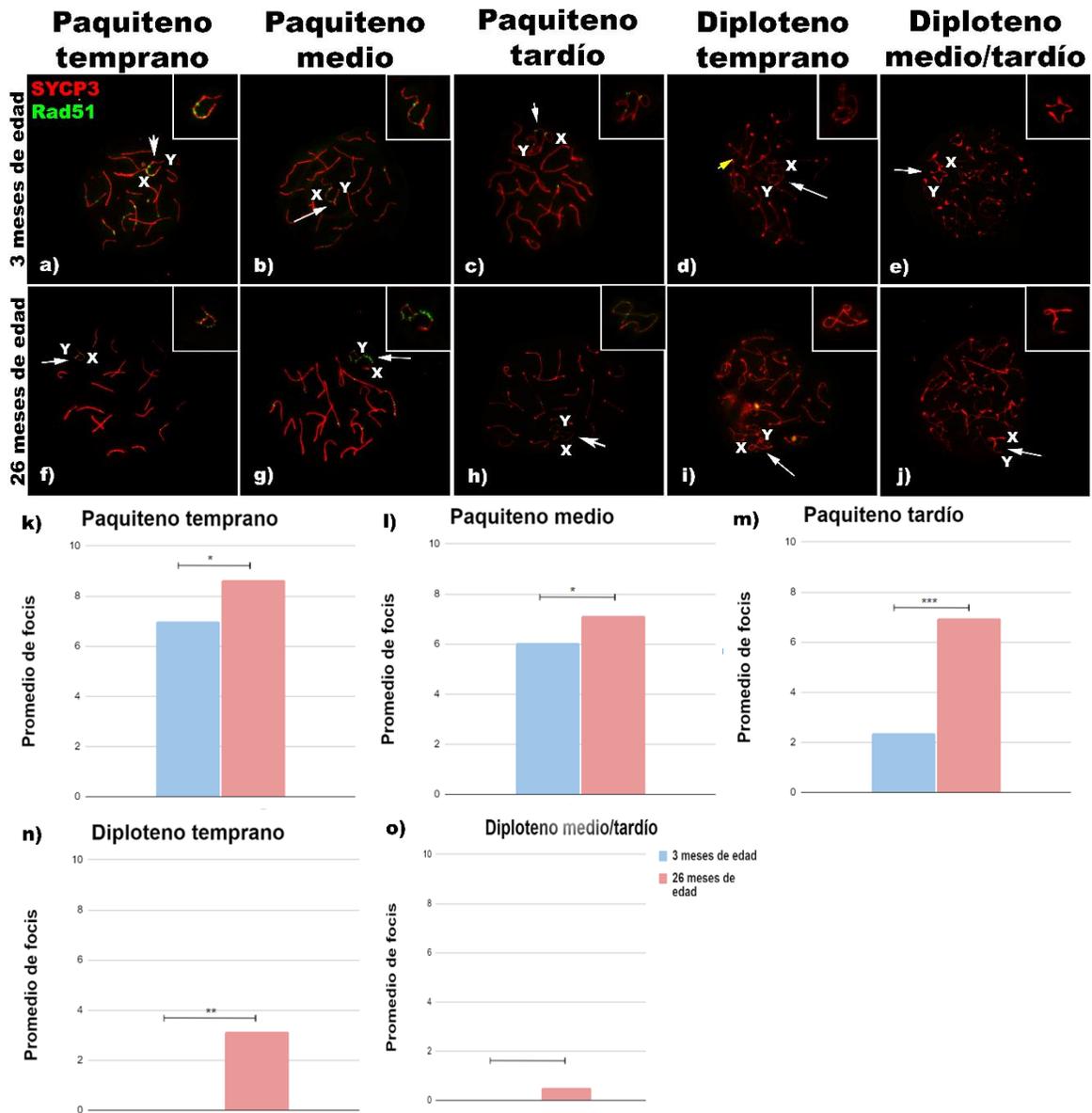
En ratones de 3 meses de edad, Rad51 se localiza como foci distribuidos en autosomas y cromosomas sexuales en estadios tempranos de la profase I como zigoteno y paquiteno temprano para posteriormente localizarse solamente en los cromosomas sexuales X y Y. Dado que en este trabajo estudiamos los procesos de reparación que ocurren en el X e Y, centraremos nuestros análisis solamente en estos cromosomas y en los estadios de paquiteno y diploteno, en donde éstos cromosomas son distinguibles e individualizables por medio de su morfología con SYCP3.

Específicamente, en paquiteno temprano observamos que Rad51 en el 80% de los espermatoцитos se localiza como foci sobre el eje del cromosoma X y no en el cromosoma Y (Figura 2a, inset) con un promedio de  $6,98 \pm 3,94$  ( $n=71$ ) foci por espermatoцитo (Figura

2k). A medida que avanzan los estadios, en paquiteno medio se observa la presencia de foci sobre el eje de los cromosomas X, pero también aparece en el cromosoma Y (Figura 2b, inset) con un promedio de  $6,02 \pm 4,57$  ( $n=45$ ) (Figura 2l). En paquiteno tardío, observamos sólo señal de Rad51 en el cromosoma X en el 62,5% de los espermatoцитos (Figura 2c, inset), con un promedio de  $2,36 \pm 3,43$  ( $n=53$ ) (Figura 2m). Ya en diploteno temprano ( $n=25$ ) (Figura 2d-e, inset) y medio/tardío ( $n=40$ ) (Figura 2n-o), no se observó señal de Rad51 en los cromosomas X e Y.

A diferencia de los ratones jóvenes, en los espermatoцитos de ratones viejos se observó un aumento en el promedio de foci por espermatoцитo en los cromosomas sexuales XY durante paquiteno y diploteno. Es así como en paquiteno temprano, se observaron foci de Rad 51 no solo en el cromosoma X sino que también en el Y (Figura 2f, inset) y con un aumento significativo de 1.23 veces más foci que en ratones controles ( $8,64 \pm 1,52$ ,  $p<0,5$ ) ( $n=45$ ) (Figura 2k). En paquiteno medio se observó un aumento de 1.18 veces más foci que espermatoцитos controles, con un promedio de  $7,11 \pm 4,20$  ( $p<0,5$ ) ( $n=72$ ) (Figura 2g, inset). Estos foci se observaron principalmente en el cromosoma sexual X, con un promedio de foci de  $5,7 \pm 3,7$ , en comparación con los  $1 \pm 1,28$  encontrados en espermatoцитos normales (Figura 2b, g; insets).

En paquiteno tardío el aumento es aún más significativo ( $p<0,0005$ ), ya que se observan 2.94 más foci tanto en cromosoma sexual X como Y (Figura 2h, inset) con un promedio de  $6,95 \pm 4,34$  ( $n=98$ ) (Figura 2m). Lo que respecta a diploteno, en diploteno temprano se observó la presencia de foci en el cromosoma sexual X (Figura 2i, inset) con un promedio de  $3,12 \pm 4,84$  ( $n=33$ ) (Figura 2n) ( $p<0,005$ ), implicando un aumento de 3 veces más respecto del control. Ya en diploteno medio/tardío no se observó prácticamente señal de Rad51 en los cromosomas sexuales XY (Figura 2i, inset) (promedio de  $0,5 \pm 2,19$ ) ( $n=56$ ) (Figura 2j,o).



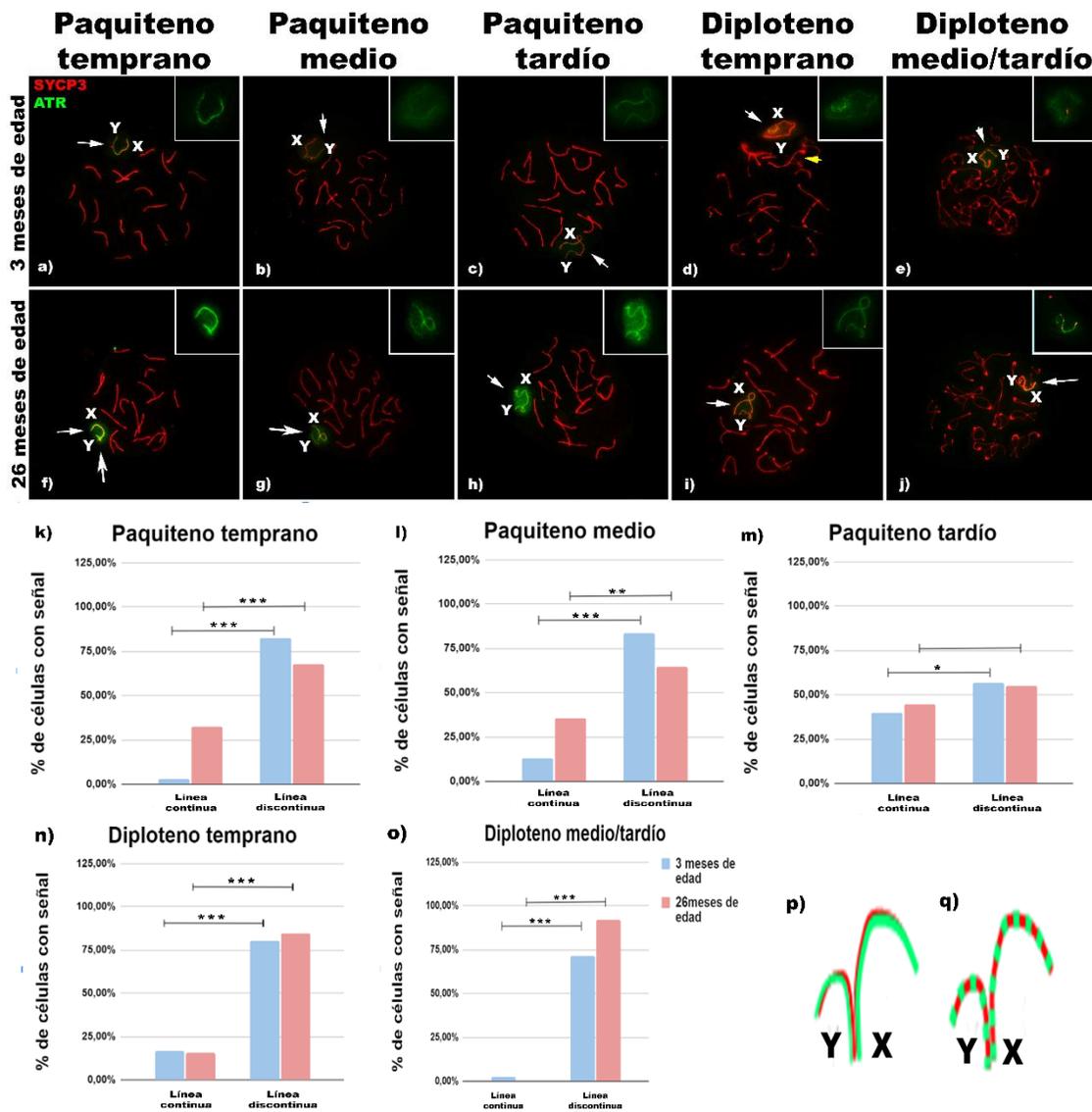
**Figura 2. Dinámica temporal y de localización de Rad51 en los cromosomas sexuales X e Y en espermatocitos de ratones de 3 y 26 meses de edad.** a-j) Localización de Rad51 en espermatocitos durante los distintos estadios de profase I. SYCP3 en rojo y Rad51 en verde. En la esquina superior derecha de cada estadio se observan los cromosomas sexuales XY con un aumento de la imagen, logrando una mejor visualización de los foci (inset). Las flechas blancas indican los cromosomas sexuales XY y la flecha amarilla indica autosomas comenzado a desinaptar. k-o) Promedio de foci en espermatocitos durante los estadios de profase I en paquiteno temprano \* $p < 0,05$  (k), paquiteno medio \* $p < 0,05$  (l), paquiteno tardío \*\*\* $p < 0,0005$  (m), diploteno temprano \*\* $p < 0,005$  (n) y diploteno medio/tardío (o).

## **El envejecimiento aumenta la presencia de ATR en cromosomas sexuales XY durante la profase I.**

Se detectó con inmunofluorescencia ATR, proteína involucrada en sensar daño en el DNA y promover la reparación de este, llevando a un silenciamiento transcripcional en los cromosomas sexuales. ATR fue detectada en conjunto con SYCP3, proteína del elemento axial del CS, permitiéndonos identificar los cromosomas sexuales y homólogos en los distintos estadios de Profase I.

En ratones de 3 meses de edad, la señal de ATR fue visible en los cromosomas X e Y en todos los espermatocitos desde paquiteno temprano a diploteno tardío. En paquiteno temprano esta señal se localizó sobre el eje de los cromosomas y desde paquiteno medio hasta diploteno, fue además visible en la cromatina de estos (Figura 3a-e, insets). Asimismo, observamos que la señal de ATR que se localiza sobre el eje de los cromosomas sexuales XY se presentó de dos formas distintas, del tipo línea discontinua y del tipo línea continua. El primer patrón se encontró entre el 83.33 y 56.64% de los espermatocitos desde paquiteno temprano a diploteno, mientras que el segundo patrón fue menos frecuente y se observó entre el 39.84 y 2.3% de los espermatocitos entre estos estadios (Figura 3k-o) (n=69, 54, 113, 36 y 42 espermatocitos en paquiteno temprano, medio, tardío, diploteno temprano, medio/tardío respectivamente).

En los ratones de 26 meses de edad, si bien el patrón de línea discontinua siguió siendo más frecuente, se produjo un aumento significativo de la señal continua sobre los cromosomas X e Y. De este modo, observamos que en paquiteno temprano y medio, la señal continua aumenta significativamente 11.19 y 2.74 veces más que el control respectivamente ( $p < 0,0005$ ), mientras que la señal discontinua disminuye 0.81 y 0.72 veces en ambos estadios ( $p < 0,05$ ) (Figura 3f-g, inset; k-l) (n=77 y 45). El incremento del patrón continuo persiste hacia finales de paquiteno, donde aumenta 1.1 veces más que el control (n=78). Ya hacia diploteno, el patrón continuo baja concomitantemente con un aumento del patrón discontinuo, observando en diploteno temprano un cambio de 0.94 y 1.04 respectivamente respecto del control (Figura 3i, inset; n) (n=32); y de 1.28 para el patrón discontinuo (Figura 3j, inset; o) (n=38). En diploteno tardío no se observó presencia de espermatocitos con señal en forma de línea continua. La importancia de estos patrones radica en dos posibilidades: un aumento de la intensidad de los foci de ATR o directamente un aumento en el número de foci de ATR que hace ver como una continuidad la señal en los ejes de los cromosomas sexuales.



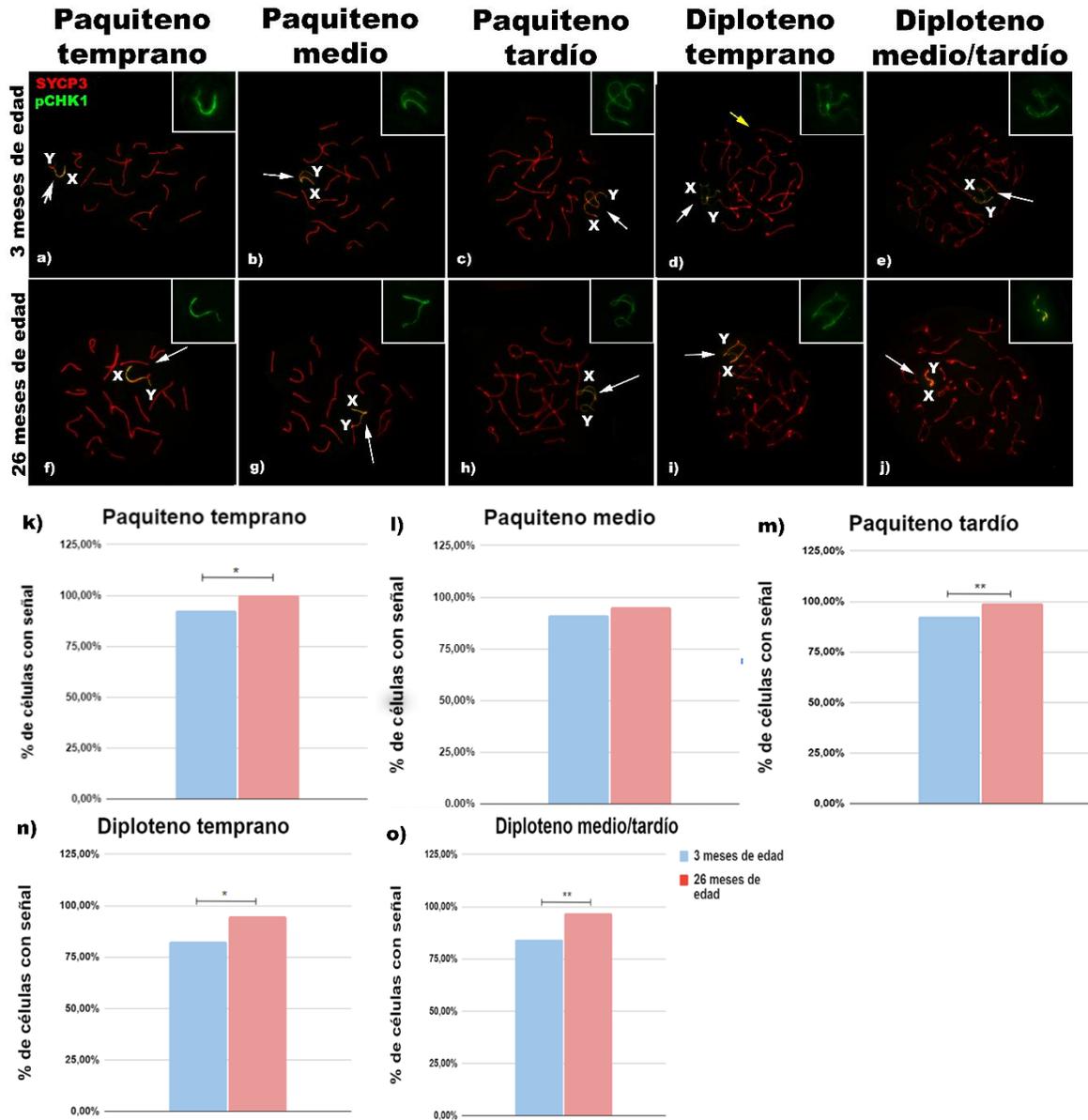
**Figura 3. El envejecimiento se asocia a cambios en la localización de ATR sobre el eje de los cromosomas sexuales X e Y.** a-j) Localización de ATR en espermatocitos durante los distintos estadios de profase I. SYCP3 en rojo y ATR en verde. En la esquina superior derecha de cada estadio se observan los cromosomas sexuales XY con un aumento de la imagen, logrando una mejor visualización de la señal (inset). Las flechas blancas indican los cromosomas sexuales XY y la flecha amarilla indica autosomas comenzado a desinaptar. k-o) Porcentajes de espermatocitos con señal en forma de línea continua y discontinua durante los estadios de profase I en ratones de 3 meses de edad y de 26 meses de edad; paquiteno temprano \* $p < 0,05$  (k), paquiteno medio \*\* $p < 0,005$  y \*\*\* $p < 0,0005$  (l), paquiteno tardío \* $p < 0,05$  (m), diploteno temprano \*\*\* $p < 0,0005$  (n) y diploteno medio/tardío \*\*\* $p < 0,0005$  (o). p y q) Representación gráfica de los tipos de señal de ATR encontrada en los cromosomas X e y. p) grafica la señal del tipo continua, mientras que q) muestra el tipo de señal discontinua.

## **La presencia de un aumento de DSBs en cromosomas sexuales gatilla la activación de proteínas de *checkpoint***

Se detectó con inmunofluorescencia pCHK1, la forma fosforilada y activa de una proteína que tiene una función de punto de control y de potenciación en el proceso de reparación del DNA. Esta detección se hizo en conjunto con la proteína del elemento axial del CS SYCP3 para identificar los cromosomas sexuales y homólogos en los distintos estadios de Profase I.

En ratones de 3 meses de edad, se observó la presencia de señal sobre el eje de los cromosomas sexuales XY en forma de línea. En paquiteno temprano (Figura 4a, inset) encontramos un 92,66% de espermatocitos con señal en los cromosomas XY (Figura 4k) (n=109), similar a lo observado para paquiteno medio (Figura 4b, inset), en donde el 91,11% de células tenía señal de pChk1 en estos cromosomas (Figura 4l) (n=135). En estadios más tardíos sigue habiendo presencia de pCHK1 en los cromosomas sexuales, donde paquiteno tardío (Figura 4c, inset), diploteno temprano (Figura 4d, inset) y diploteno medio/tardío (Figura 4e, inset) presentan porcentajes de 92,62% (n=149) (Figura 4m), 82,42% (n=91) (Figura 4n) y 84,09% (n=88) (Figura 4o) respectivamente.

En ratones de 26 meses de edad, se observa un aumento en los porcentajes de espermatocitos con presencia de señal en los cromosomas sexuales XY. En paquiteno temprano (Figura 4f, inset) existe un porcentaje de 100% (n=50) ( $p < 0,5$ ) y paquiteno medio (Figura 4g, inset) presenta un porcentaje de 95,41% (n=109), por lo que no se observa una diferencia estadísticamente significativa. En estadios más tardíos si se observa un aumento significativo de espermatocitos con pChk1 en los cromosomas sexuales, donde paquiteno tardío (Figura 4h, inset), diploteno temprano (Figura 4i, inset) y diploteno medio/tardío (Figura 4j, inset) presentan porcentajes de 99,28% (n=139) ( $p < 00,5$ ), 94,87% (n=39) ( $p < 0,5$ ) y 96,88% (n=96) ( $p < 00,5$ ), respectivamente.



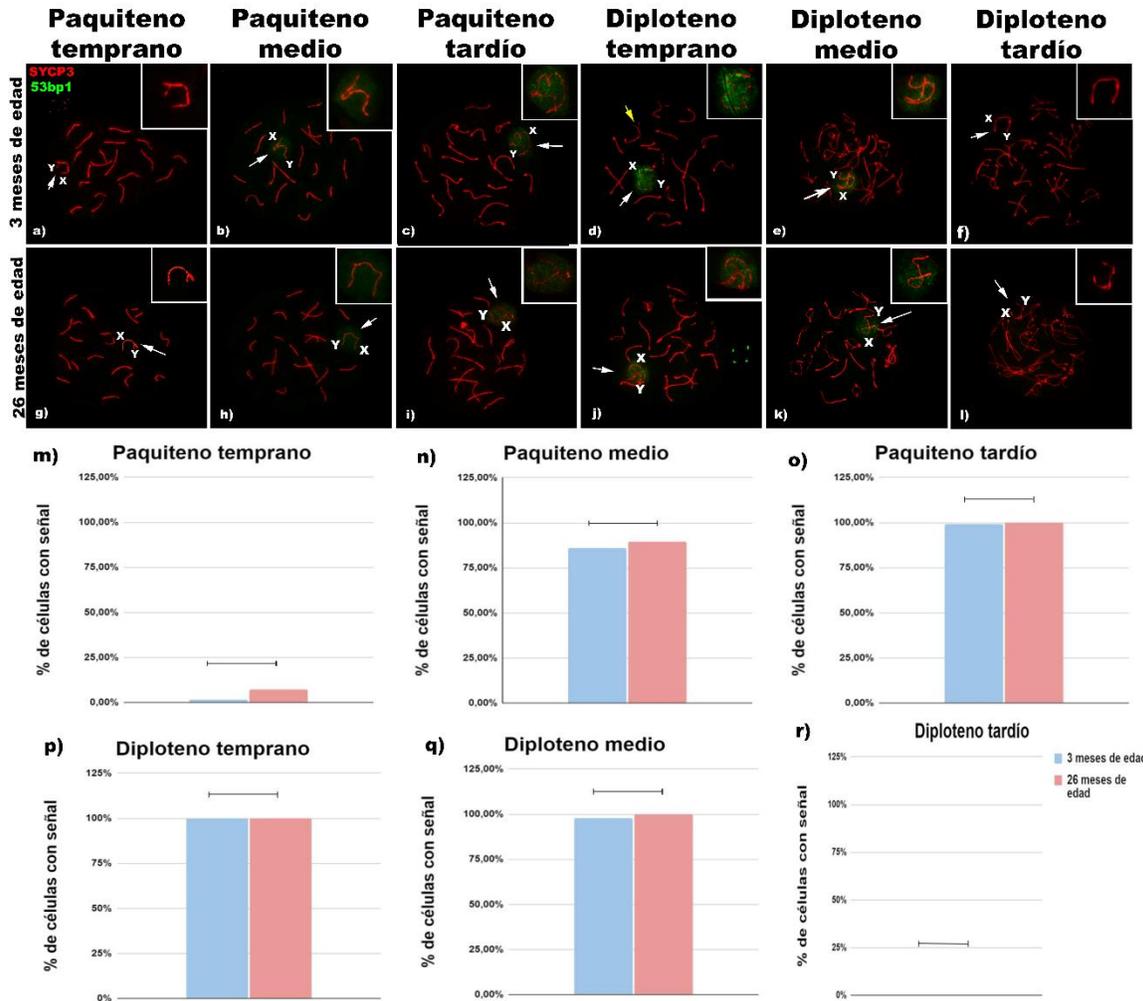
**Figura 4. El envejecimiento produce un aumento de pChk1 en los cromosomas sexuales X e Y hacia finales de la profase I.** a-j) Localización de pCHK1 en espermatocitos durante los distintos estadios de profase I. SYCP3 en rojo y pCHK1 en verde. En la esquina superior derecha de cada estadio se observan los cromosomas sexuales XY con un aumento de la imagen, logrando una mejor visualización de la señal (inset). Las flechas blancas indican los cromosomas sexuales XY y la flecha amarilla indica autosomas comenzado a desinaptar. k-o) Porcentajes de espermatocitos con señal presente durante los estadios de profase I en ratones de 3 meses de edad y de 26 meses de edad; paquiteno temprano \* $p < 0,05$  (k), paquiteno medio (l), paquiteno tardío \*\* $p < 0,005$  (m), diploteno temprano \* $p < 0,05$  (n) y diploteno medio/tardío \*\* $p < 0,005$  (o).

**Los DSBs producidos en los cromosomas sexuales por causa del envejecimiento no alteran la dinámica de activación y localización de proteínas de la vía de recombinación no homóloga dependiente como 53bp1.**

Se detectó con inmunofluorescencia 53bp1, proteína encargada de la reparación de DSBs. 53bp1 fue detectada en conjunto con SYCP3, proteína del elemento axial del CS, permitiéndonos identificar los cromosomas sexuales y homólogos en los distintos estadios de Profase I.

En ratones de 3 meses de edad, se observó presencia de señal distribuida de forma homogéneamente en la cromatina de los cromosomas sexuales XY, sin presencia de esta en el eje de los cromosomas, en algunos de los estadios de profase I. En paquiteno temprano (Figura 5a, inset) sólo un 1,45% (n=69) de los espermatoцитos presenta señal (Figura 5m). En paquiteno medio (Figura 5b, inset) comienza a aparecer la señal distribuida en la cromatina de los cromosomas sexuales XY, donde se encuentra, con una intensidad más bien débil, en un 86,02% (n=93) de los espermatoцитos (Figura 5n). En los estadios más avanzados como paquiteno tardío (Figura 5c, inset) y diploteno temprano (Figura 5d, inset) se observa una señal más intensa, con porcentajes de 98,92% (n=93) (Figura 5o, inset) y 100% (n=78) (Figura 5p) de células con presencia de señal, respectivamente. En diploteno medio (Figura 5e, inset) la señal en los cromosomas sexuales vuelve a disminuir en intensidad, manteniéndose en un 97,87% (n=47) de las células (Figura 5q). En el último estadio, correspondiente a diploteno tardío (Figura 5f, inset), desaparece la señal en la cromatina de los cromosomas sexuales XY de los espermatoцитos (n=73) (Figura 5r).

En ratones de 26 meses de edad, se observa un patrón similar en la señal de 53bp1, estando esta distribuida en la cromatina de los cromosomas sexuales XY. En paquiteno temprano (Figura 5g, inset) existe un 7,14% (n=28) de células totales con presencia de señal, con un *fold change*=2,46. Al igual que en ratones de 3 meses de edad, en paquiteno medio (Figura 5h, inset) comienza a aparecer en un 89,66% (n=29) de los espermatoцитos, con un *fold change*=3,2. En estadios más avanzados, se sigue visualizando la señal, donde paquiteno tardío (n=55) (*fold change* =1,69) (Figura 5i, inset) y diploteno temprano (n=29) (*fold change*=2,69) (Figura 5j, inset) presentan porcentajes de 100% de células con presencia de señal, cada uno. Diploteno medio (Figura 5k, inset) presenta una intensidad en la señal alta y en el 100% (n=14) (*fold change*=3,36) de los espermatoцитos. En diploteno tardío ya no se visualiza señal en la cromatina de los cromosomas sexuales XY de los espermatoцитos (n=34) (*fold change*=2,15) (Figura 5l, inset).



**Figura 5. El envejecimiento no cambia la dinámica de localización de 53BP1 como parte del MSC1.** a-l) Localización de 53bp1 en espermatoцитos durante los distintos estadios de profase I. SYCP3 en rojo y 53bp1 en verde. En la esquina superior derecha de cada estadio se observan los cromosomas sexuales XY con un aumento de la imagen, logrando una mejor visualización de la señal (inset). Las flechas blancas indican los cromosomas sexuales XY y la flecha amarilla indica autosomas comenzado a desinaptar. m-r) Porcentajes de espermatoцитos con señal presente durante los estadios de profase I en ratones de 3 meses de edad y de 26 meses de edad; paquiteno temprano (m), paquiteno medio (n), paquiteno tardío (o), diploteno temprano (p), diploteno medio (q) y diploteno tardío (r).

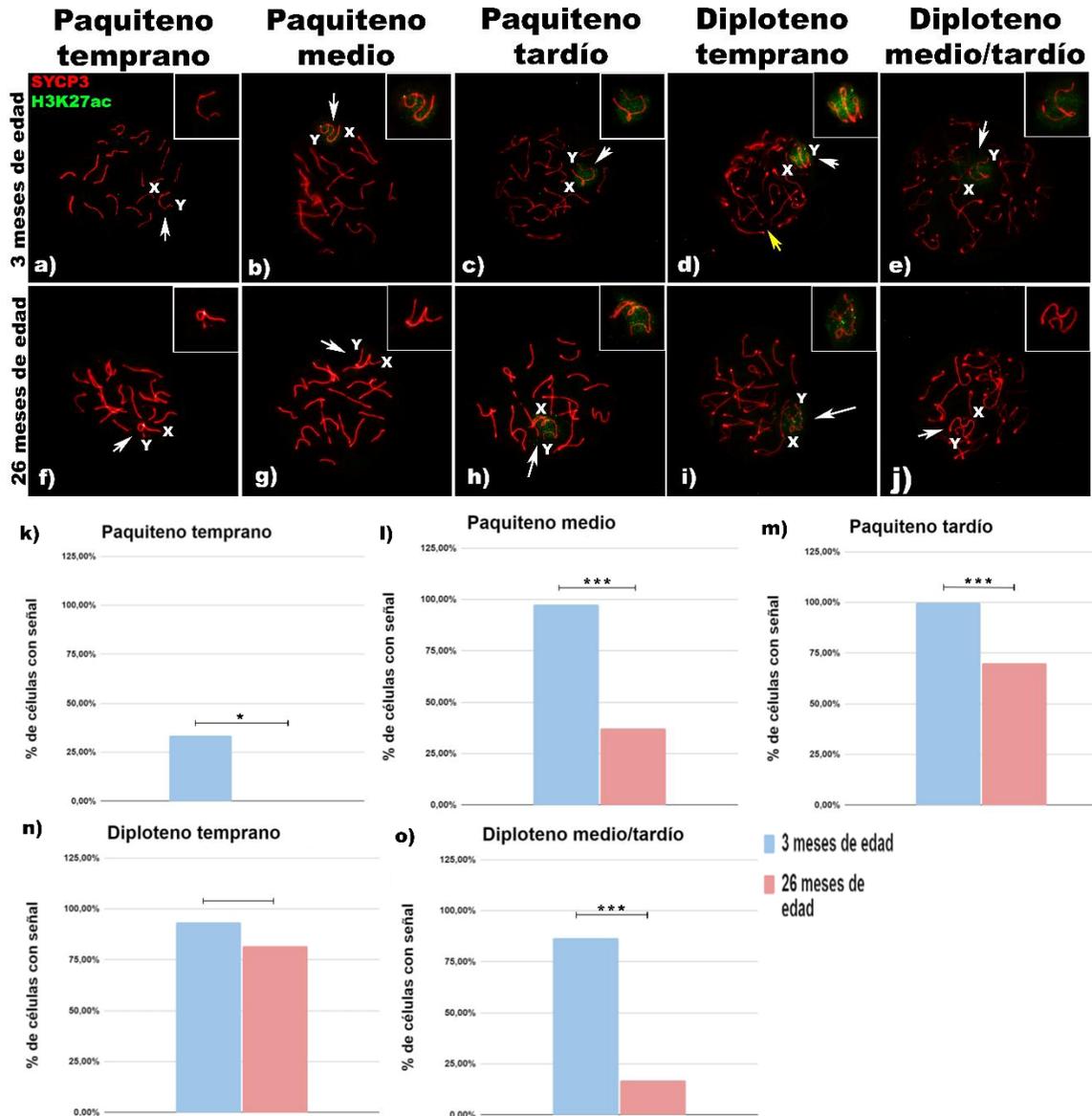
### El envejecimiento compromete el establecimiento del MSC1 que ocurre hacia profase I tardío

Para determinar si la persistencia de DSBs en los cromosomas sexuales afecta el establecimiento del MSC1 y posterior reprogramación epigenética del genoma de los cromosomas X e Y, estudiamos el patrón temporal y de localización de la histona H3K27ac.

Esta histona se localiza en regiones activas transcripcionalmente del genoma y junto a H3K4me2 programa regiones ricas en genes para escapar de la represión que impone el MSCI.

En ratones de 3 meses de edad, se observó presencia de señal distribuida de forma homogénea en la cromatina de los cromosomas sexuales XY, sin presencia de esta en el eje de los cromosomas, en algunos de los estadios de profase I. En paquiteno temprano (Figura 6a, inset) sólo un 33,33% (n=6) de los espermatocitos presenta señal en la cromatina (Figura 6k). En paquiteno medio (Figura 6b, inset) se comienza a observar la aparición de señal en la cromatina de los cromosomas sexuales XY, en un porcentaje de 97,43% (n=39) (Figura 6l). En estadios más avanzados y finales de profase I sigue habiendo presencia de señal en la cromatina, donde paquiteno tardío (Figura 6c, inset), diploteno temprano (Figura 6d, inset) y diploteno medio/tardío presentan porcentajes de 100% (n=53) (Figura 6m), 93,33% (n=15) (Figura 6n) y 86,66% (n=15) (Figura 6o) de espermatocitos con señal, respectivamente.

En ratones de 26 meses de edad, se observa un patrón distinto de localización de la señal durante los distintos estadios de profase I. En paquiteno temprano (n=13) (Figura 6f, inset) no existe presencia de señal en la cromatina ( $p < 0,05$ ) y en paquiteno medio (Figura 6g, inset) el porcentaje de espermatocitos con señal sólo es un 37,25% (n=51) ( $p < 0,0005$ ). La aparición de señal comienza recién en paquiteno tardío (Figura 6h, inset) con un 70% (n=60) ( $p < 0,0005$ ) de espermatocitos con señal en la cromatina de los cromosomas sexuales. En diploteno temprano (Figura 6i, inset) se mantiene la señal con un 81,81% (n=22), pero en diploteno medio/tardío (Figura 6j, inset) la señal disminuye nuevamente, con solo un 17,07% (n=41) ( $p < 0,0005$ ) de los espermatocitos con presencia de la modificación de esta histona.



**Figura 6. Resultados de localización de H3K27ac.** a-j) Localización de H3K27ac en espermatocitos durante los distintos estadios de profase I. SYCP3 en rojo y H3K27ac en verde. En la esquina superior derecha de cada estadio se observan los cromosomas sexuales XY con un aumento de la imagen, logrando una mejor visualización de la señal (inset). Las flechas blancas indican los cromosomas sexuales XY y la flecha amarilla indica autosomas comenzado a desinaptar. k-o) Porcentajes de espermatocitos con señal presente durante los estadios de profase I en ratones de 3 meses de edad y de 26 meses de edad; paquiteno temprano \* $p < 0,05$  (k), paquiteno medio \*\*\* $p < 0,0005$  (l), paquiteno tardío \*\*\* $p < 0,0005$  (m), diploteno temprano (n) y diploteno medio/tardío \*\*\* $p < 0,0005$  (o).

## Discusión

En este trabajo se buscó determinar si el envejecimiento está afectando la estabilidad genómica de los cromosomas sexuales X e Y durante la meiosis masculina, ya sea por generación y/o reparación de DSBs. Se observó, que en cromosomas sexuales X e Y, el envejecimiento genera un aumento significativo en el promedio de foci de Rad51 presente en los distintos estadios de profase I, específicamente desde paquiteno temprano hasta diploteno temprano, esto indica que existe un aumento de DSBs en los cromosomas sexuales X e Y relacionados con el envejecimiento.

Esto también se evidenció por el aumento en la presencia de ATR en los cromosomas sexuales, proteína que participa en la reparación de DSBs, donde en ratones de 26 meses de edad se vio un aumento de espermatoцитos que presentaban una señal en forma de "línea continua" en los primeros estadios de profase I, específicamente en paquiteno temprano, paquiteno medio y paquiteno tardío. Lo que respecta a los estadios más avanzados, en diploteno temprano y medio/tardío de ratones envejecidos existe un porcentaje significativamente mayor de espermatoцитos con presencia de ATR, en comparación a ratones jóvenes, lo cual nos sugiere que existe un mayor daño en el DNA relacionado al envejecimiento.

Así mismo, otra proteína que sufrió cambio significativo fue CHK1, proteína que cumple una importante función en la reparación del DNA, ya que actúa como punto de control [36]. Se observó que con el aumento de DSBs en los cromosomas sexuales, se gatilla la activación de *checkpoint*, los cuales se producen sin cambios durante los primeros estadios, es decir paquiteno temprano y paquiteno medio. Sin embargo, avanzada la profase I, se observa que en estadios más tardíos existe un aumento significativo en la presencia de CHK1, específicamente en paquiteno tardío, diploteno temprano y diploteno medio/tardío, lo que indicaría que existe un porcentaje importante de DSBs que no están siendo reparados.

Por otro lado, se encontró que la presencia de 53bp1, proteína involucrada en la reparación de estas DSBs por la vía de recombinación no homologa, se mantiene con conductas similares de expresión, localización y temporalidad en cromosomas sexuales X e Y, tanto en ratones jóvenes como ratones viejos, comenzando a verse su aparición en paquiteno medio, manteniéndose durante paquiteno tardío, diploteno temprano y diploteno medio, para luego desaparecer finalizando la profase I, específicamente en diploteno tardío. Debido a la diferencia en los n de ratones jóvenes y n de ratones envejecidos durante los

distintos estadios, calculando el *fold change* se concluye que en paquiteno temprano existe 2,46 espermatoцитos más de ratones jóvenes en comparación a ratones envejecidos, lo mismo ocurre en paquiteno medio con 3,2, paquiteno tardío con 1,69, diploteno temprano 2,69 células, en diploteno medio 3,36 células y diploteno tardío 2,15 células más en ratones jóvenes, lo que estima que podría existir cierta significancia estadística.

Lo que respecta a modificaciones de histonas, se evidenció un cambio significativo respecto a la temporalidad en la aparición de H3K27ac asociado al envejecimiento. Se observó que su aparición en ratones viejos comienza en paquiteno medio, manteniéndose durante paquiteno tardío y diploteno temprano, pero aún en menor cantidad en comparación a ratones jóvenes, para luego en diploteno medio/tardío volver a descender en el porcentaje de espermatoцитos con presencia de la modificación de histona, lo que sugiere un daño causado por el envejecimiento. Estos resultados podrían verse beneficiados y complementados si se estudian otras modificaciones de histonas como H3K9ac y ubH2A.

Como se ha visto en estudios anteriores, el envejecimiento se relaciona con alteraciones epigenéticas e inestabilidad genómica [10], donde se relacionan con rupturas en el DNA y daño en las vías de reparación de este, principalmente en los autosomas de espermatoцитos, pero no existen mayores estudios que relacionen esto con los cromosomas sexuales X e Y. Los resultados de este estudio nos sugieren que estos eventos también están afectando a los cromosomas sexuales X e Y en espermatoцитos de ratones envejecidos, donde se evidenció que existe un aumento de DSBs y a su vez un cambio en la temporalidad de aparición de proteínas involucradas con su reparación, además de cambios que estarían afectando a la represión de la expresión génica y a su vez en la formación del MSCI.

## Conclusiones

- En ratones machos, el aumento en la edad, produce un aumento en la cantidad de foci de Rad51 en cromosomas sexuales X e Y, donde en ratones de 26 meses de edad se observa un aumento significativo de los promedios de foci en estadios de paquiteno temprano, paquiteno medio, paquiteno tardío y diploteno temprano.
- Existe un aumento en la presencia de ATR en cromosomas sexuales de ratones envejecidos.
  - Se observa un cambio en la expresión de ATR, en ratones de 26 meses de edad, en estadios tempranos, afectando principalmente a paquiteno temprano, paquiteno medio y paquiteno tardío.
  - En estadios más tardíos, como diploteno temprano y medio/tardío, los ratones de 26 meses de edad presentan un mayor porcentaje de espermatoцитos con presencia de ATR en los cromosomas sexuales.
- El envejecimiento produce cambios en la reparación de DSBs, lo que gatilla un aumento en la expresión de CHK1 durante estadios más tardíos, como paquiteno tardío, diploteno temprano y diploteno medio/tardío
- La vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ) no se ve afectada por el envejecimiento, ya que no se observan cambios en la expresión, localización o temporalidad de 53bp1 en cromosomas sexuales
- El envejecimiento podría afectar al proceso de represión de la expresión génica durante el MSCI, viéndose afectada la temporalidad de H3K27ac a lo largo de los estadios de profase I.
- Producto del envejecimiento, existe un aumento de DSBs en los cromosomas sexuales en las etapas iniciales de profase I, además de existir un cambio en la reparación de estos, lo que gatilla durante las etapas tardías un aumento en la activación de proteínas de *checkpoint* como CHK1. Esto también sugiere que se vea afectado el proceso de establecimiento de MSCI.
- El envejecimiento masculino afecta de manera directa en la estabilidad genómica de los cromosomas sexuales X e Y durante la meiosis masculina de ratón, debido a la formación de nuevos DSBs y su errónea reparación.

## Bibliografía

1. Rabaça A, Ferreira C, Sá R. Aging of the Male Germline: Influence of Advanced Male Age on Reproductive Outcome. *Andrology*. 2016;5(1):152.
2. Hamilton BE, Martin JA, Osterman MJ, Curtin SC, Matthews TJ. Births: Final Data for 2014. *Natl Vital Stat Rep*. 2015;64(12):1-64.
3. Instituto, Nacional, Estadísticas. Anuario de estadísticas vitales. 2017-2020.
4. Gonzalez DC, Ory J, Blachman-Braun R, Nackeeran S, Best JC, Ramasamy R. Advanced Paternal Age and Sperm DNA Fragmentation: A Systematic Review. *World J Mens Health*. 2021.
5. Cao M, Shao X, Chan P, Cheung W, Kwan T, Pastinen T, et al. High-resolution analyses of human sperm dynamic methylome reveal thousands of novel age-related epigenetic alterations. *Clin Epigenetics*. 2020;12(1):192.
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. Pilsner JR, Shershebnov A, Wu H, Marcho C, Dribnokhodova O, Shtratnikova V, et al. Aging-induced changes in sperm DNA methylation are modified by low dose of perinatal flame retardants. *Epigenomics*. 2021;13(4):285-97.
8. Guo Y, Bai D, Liu W, Liu Y, Zhang Y, Kou X, et al. Altered sperm tsRNAs in aged male contribute to anxiety-like behavior in offspring. *Aging Cell*. 2021;20(9):e13466.
9. Liang K, Yao L, Wang S, Zheng L, Qian Z, Ge Y, et al. miR-125a-5p increases cellular DNA damage of aging males and perturbs stage-specific embryo development via Rbm38-p53 signaling. *Aging Cell*. 2021;20(12):e13508.
10. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
11. Yang L, Mih N, Anand A, Park JH, Tan J, Yurkovich JT, et al. Cellular responses to reactive oxygen species are predicted from molecular mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(28):14368-73.
12. Vijg J, Suh Y. Genome instability and aging. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:645-68.
13. Nguyen-Powanda P, Robaire B. Oxidative Stress and Reproductive Function in the Aging Male. *Biology (Basel)*. 2020;9(9):282.
14. Baudat F, Imai Y, de Massy B. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat Rev Genet*. 2013;14(11):794-806.
15. Keeney S, Neale MJ. Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 4):523-5.
16. Yadav V. K, Claeys Bouuaert C. Mechanism and Control of Meiotic DNA Double-Strand Break Formation in *S. cerevisiae*. *Front Cell Dev. Biol*. 2021;9:642737.
17. Inagaki A, Schoenmakers S, Baarends W.M. DNA double strand break repair, chromosome synapsis and transcriptional silencing in meiosis *Epigenetics*. Landes Bioscience. 2010;5(4):255-266.
18. Borner GV. Balancing the checks: surveillance of chromosomal exchange during meiosis. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 4):554-6.
19. Turner JM, Mahadevaiah SK, Ellis PJ, Mitchell MJ, Burgoyne PS. Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Dev Cell*. 2006;10(4):521-9.

20. Page J, de la Fuente R, Gomez R, Calvente A, Viera A, Parra MT, et al. Sex chromosomes, synapsis, and cohesins: a complex affair. *Chromosoma*. 2006;115(3):250-9.
21. Alavattam KG, Maezawa S, Andreassen PR, Namekawa SH. Meiotic sex chromosome inactivation and the XY body: a phase separation hypothesis. *Cell Mol Life Sci*. 2021;79(1):18.
22. 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.
23. Inagaki A, Schoenmakers S, Baarends WM. DNA double strand break repair, chromosome synapsis and transcriptional silencing in meiosis. *Epigenetics*. 2010;5(4):255-66.
24. Baarends WM, Wassenaar E, van der Laan R, Hoogerbrugge J, Sleddens-Linkels E, Hoeijmakers JH, et al. Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis. *Mol Cell Biol*. 2005;25(3):1041-53.
25. Turner JM, Aprelikova O, Xu X, Wang R, Kim S, Chandramouli GV, et al. BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol*. 2004;14(23):2135-42.
26. Khalil AM, Boyar FZ, Driscoll DJ. Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(47):16583-7.
27. Khalil AM, Driscoll DJ. Histone H3 lysine 4 dimethylation is enriched on the inactive sex chromosomes in male meiosis but absent on the inactive X in female somatic cells. *Cytogenet Genome Res*. 2006;112(1-2):11-5
28. Qu W, Liu C, Xu YT, Xu YM, Luo MC. The formation and repair of DNA double-strand breaks in mammalian meiosis. *Asian J Androl*. 2021;23(6):572-9.
29. Lu LY, Yu X. Double-strand break repair on sex chromosomes: challenges during male meiotic prophase. *Cell Cycle*. 2015;14(4):516-25.
30. Turner JMA. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development*. 2007; 134(10):1823-1831.
31. Kato Y, Alavattam KG, Sin HS, Meetei AR, Pang Q, Andreassen PR, et al. FANCB is essential in the male germline and regulates H3K9 methylation on the sex chromosomes during meiosis. *Hum Mol Genet*. 2015;24(18):5234-49.
32. Adams, S.R., et al., *RNF8 and SCML2 cooperate to regulate ubiquitination and H3K27 acetylation for escape gene activation on the sex chromosomes*. *PLoS Genet*, 2018. **14**(2): p. e1007233.
33. Selvaratnam JS, Robaire B. Effects of Aging and Oxidative Stress on Spermatozoa of Superoxide-Dismutase 1- and Catalase-Null Mice. *Biol Reprod*. 2016;95(3):60.
34. Borner GV. Balancing the checks: surveillance of chromosomal exchange during meiosis. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 4):554-6.
35. Titus S, Li F, Stobezki R, Akula K, Unsal E, Jeong K, et al. Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. *Sci Transl Med*. 2013;5(172):172ra21.
36. Abe H, Alavattam KG, Kato Y, et al. CHEK1 coordinates DNA damage signaling and meiotic progression in the male germline of mice. *Human Molecular Genetics*. 2018;0(0):1-14.
37. Manterola M, Brown TM, Oh MY, Garyn C, Gonzalez BJ, Wolgemuth DJ. BRDT is an essential epigenetic regulator for proper chromatin organization, silencing of sex chromosomes and crossover formation in male meiosis. *PLoS Genet*. 2019;14(3): e1007209.

## 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](http://www.uchile/cicua.cl) email: [coordinador.cicua@uchile.cl](mailto:coordinador.cicua@uchile.cl)

## Anexo 2

### Aprobación uso animales envejecidos bioética animales



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE INVESTIGACION 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, 13de 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](mailto:cba@med.uchile.cl)

### Anexo 3

### Acta curso trabajo de investigación



Santiago, 24 de enero de 2024

#### ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La Srta. **Karina Andrea Bustamante Villalobos**, 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: “**Efecto del envejecimiento en la estabilidad genómica de los cromosomas sexuales X e Y durante la meiosis masculina de ratón**”, dirigida por la **Dra. Marcía Manterola**, académica del Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por: **Dra. M. Leonor Bustamante**, académica del Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. y la **Prof. Isabel Castro Massó**, académica del Departamento de Tecnología Médica, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La calificación obtenida se detalla a continuación:

Corrector 1 <b>Dra. M. Leonor Bustamante</b>	7.00	25%
Corrector 2 <b>Prof. Isabel Castro Massó</b>	6.82	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	7.00	25%
Nota final tutor	7.00	25%
<b>Nota final tesis profesional</b>	<b>6.96</b>	

En consecuencia la estudiante **Karina Andrea Bustamante Villalobos** aprueba satisfactoriamente la asignatura.

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

HERNAN RODRIGO TORRES RIVERA  
15.932.579-2  
24/01/2024 - 14:12  
ESTE DOCUMENTO CONTIENE FIRMA ELECTRÓNICA AVANZADA  
FIRMA: 0780B404E1C478E0C4683C9194E6C4D7  
CV: 876244778548048308848

**Prof. Hernán Torres.**  
PEC curso  
Trabajo de Investigación