



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en

Veterinaria

IMPACTO DEL ENVEJECIMIENTO EN EL MAPA EPIGENÉTICO DEL OVOCITO DE
MAMÍFERO

THE IMPACT OF AGING ON THE EPIGENETIC MAP OF THE MAMMALIAN OOCYTE

Autor/es

Lucía Oriol Caballo

Director/es

Raquel Pérez Palacios

María Climent Aroz

Facultad de Veterinaria

2023

INDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Epigenética.....	3
2.1.1 Modificaciones epigenéticas en histonas y metilación de histonas	3
2.1.2 Patrones y distribución de H3K4me3 en células somáticas.....	4
2.2 Epigenoma del ovocito	5
2.2.1 Patrones y distribución de H3K4me3 en el ovocito	6
2.3 Epigenética en el envejecimiento	8
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	9
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
5.1 Estudio de las modificaciones postraduccionales de histona en el envejecimiento del ovocito	14
5.2 Adaptación de un método de estudio para analizar diferencias de H3K4me3 en el envejecimiento de ovocitos	19
5.3 Cuantificación de H3K4me3 mediante inmunofluorescencia	24
6. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS.....	28
7. VALORACIÓN PERSONAL	30
8. BIBLIOGRAFÍA	31
9. ANEXOS	35

1. RESUMEN/ABSTRACT

Resumen:

El envejecimiento juega un papel fundamental en la fertilidad. Por esta razón, es crucial comprender las alteraciones moleculares del envejecimiento reproductivo y las consecuencias fenotípicas derivadas de este. Diversas marcas epigenéticas, tales como las modificaciones histonas, están implicadas y afectadas de forma significativa durante el envejecimiento. Se han realizado numerosos estudios para caracterizar las modificaciones en el epigenoma de células somáticas, pero existe cierto desconocimiento acerca de cómo el envejecimiento repercute en los ovocitos. Esto se debe en gran parte a la escasez y gran valor biológico de estas células, así como de la ausencia hasta la fecha de métodos de análisis suficientemente sensibles que permitan la obtención de resultados significativos usando un número limitado de células.

El primer propósito de esta memoria es recopilar e interpretar los datos que se conocen hasta ahora sobre las alteraciones que se producen durante el envejecimiento en la acetilación y metilación de histonas en ovocitos de mamíferos, dos de las modificaciones postraduccionales mejor caracterizadas en su vinculación con el envejecimiento. Posteriormente, este trabajo se centra en el estudio de la trimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3) en el envejecimiento del ovocito, una marca epigenética que además de su gran interés en relación con la regulación de la expresión génica presenta características funcionales y patrones de distribución genómica específicos del ovocito . Así, en segundo lugar, se propone la adaptación de una novedosa técnica de análisis de la distribución genómica de modificaciones de histonas para poder generar perfiles de histonas de alta resolución usando una cantidad muy reducida de células somáticas, con el objetivo de su posterior aplicación en el estudio de H3K4me3 en el envejecimiento de ovocitos. Finalmente, en este trabajo se lleva a cabo la detección y cuantificación de los niveles de H3K4me3 en ovocitos de ratón jóvenes y viejos mediante ensayos de inmunofluorescencia para analizar la tendencia de esta marca en el envejecimiento, considerando factores como el estado de condensación de la cromatina del ovocito. En resumen, este trabajo profundizará en el conocimiento de las modificaciones de histona en ovocitos y sus patrones de distribución, con el objetivo de comprender mejor su comportamiento durante el envejecimiento. Además de ampliar la información ya conocida sobre H3K4me3, se orienta a proporcionar nuevas perspectivas y aproximaciones metodológicas para investigaciones futuras en este ámbito de estudio.

Abstract:

Aging plays a crucial role in fertility. For this reason, it is crucial to understand the molecular alterations of reproductive aging and the phenotypic consequences derived from it. Various epigenetic marks, such as histone modifications, are implicated and significantly affected during aging. Numerous studies have been conducted to characterize epigenome modifications in somatic cells, but there is still some uncertainty about how aging impacts oocytes. This is largely due to the availability and high biological value of these cells, as well as the lack, to date, of sufficiently sensitive analysis methods that allow obtaining meaningful results using a limited number of cells.

The primary purpose of this dissertation is to compile and interpret the data known so far about alterations that occur during aging in the acetylation and methylation of histones in mammalian oocytes, two of the best-characterized post-translational modifications in their association with aging. Subsequently, this work focuses on the study of trimethylation of lysine 4 on histone 3 (H3K4me3) in oocyte aging, an epigenetic mark that, in addition to its significant interest in gene expression regulation, presents functional characteristics and genomic distribution patterns specific to the oocyte. Secondly, the adaptation of a novel technique for analyzing the genomic distribution of histone modifications is proposed to generate high-resolution histone profiles using a minimal number of somatic cells, with the aim of its subsequent application in studying H3K4me3 changes in oocyte aging. Finally, this study detects and quantifies the levels of H3K4me3 in young and old mouse oocytes through immunofluorescence assays to analyze the trend of this mark during aging, considering factors such as the condensation state of the oocyte chromati. In summary, this research aims to deepen our comprehension of histone modifications in oocytes, elucidating their distribution patterns and behavior during the aging process. In addition to expanding current knowledge of H3K4me3, the study aspires to introduce novel perspectives and methodological approaches for future research in this field.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Epigenética

Se entiende por epigenética a todas aquellas modificaciones bioquímicas hereditarias y estructurales de la cromatina en las que la secuencia de ADN no se ve alterada, pero sí influyen en la regulación de procesos tales como la transcripción génica, la organización de la cromatina o la reparación del ADN, entre otros (Hamilton y Nestler, 2019). La investigación epigenética se trata de un campo de estudio que aborda todos aquellos fenómenos que los investigadores son incapaces de explicar mediante la genética simple y la desconexión entre un gen y sus propiedades fenotípicas (Deans y Maggert, 2015). Entre todas las modificaciones epigenéticas registradas, destacan tres: la metilación del ADN, el ARN no codificante y las modificaciones de histonas. (Li, 2021).

2.1.1 Modificaciones epigenéticas en histonas y metilación de histonas

La unidad estructural fundamental de la cromatina en las células eucariotas es el nucleosoma, compuesto por 147 pares de bases de ADN y un octámero de proteínas histonas, con dos ejemplares de cada una de ellas H2A, H2B, H3 y H4 (Lin et al., 2020). La histona es una pequeña proteína básica que contiene dominios globulares y extremos N-terminales flexibles que sobresalen del núcleo del nucleosoma siendo susceptibles a modificaciones postraduccionales tales como la acetilación (-ac), metilación (-me), fosforilación, ribosilación de ADP, ubiquitinación y sumoilación (Xiang et al., 2022). Esta memoria se enfoca especialmente en la metilación de histonas, una de las modificaciones abordadas en este trabajo.

La metilación de histonas ocurre principalmente en residuos de lisina, que puede presentar monometilación, dimetilación o trimetilación (me1, me2 o me3, respectivamente), y en residuos de arginina, que puede presentar monometilación. La función principal de esta modificación radica en su capacidad para reclutar factores que activen o inhiban la transcripción del genoma (Michalak et al., 2019). Esta función va a depender de varios factores como la ubicación y tipo de metilación, los patrones de metilación, la interacción con otras modificaciones de histonas, contexto genómico o la actuación de las proteínas lectoras (He et al., 2021). La metilación se debe a una reacción de alquilación donde un grupo metilo reemplaza a un átomo de hidrógeno. Las enzimas histona metiltransferasa (HMT), catalizan este fenómeno utilizando el sustrato S-adenosilmetionina (SAM) como donante del grupo metilo, convirtiéndose en S-adenosilhomocisteína (SAH) (Figura 1; A). Las enzimas histona desmetilasa (HDM) tienen el efecto contrario, transfiriendo la metilación del residuo de histona a una molécula receptora

(Figura 1; B). Cuando la metilación sucede en residuos de lisina las HMT se conocen como histonas lisina metiltransferasa (KMT), y las HDM se conocen como histonas lisina desmetilasa (Wang, Yuan y Xie, 2018). Hasta hace poco, se solía pensar que los grupos metilo eran modificaciones bastante estables, pero la identificación de estas enzimas específicas ha revelado que la metilación se trata de un proceso dinámico que puede responder a cambios externos (Michalak et al., 2019).

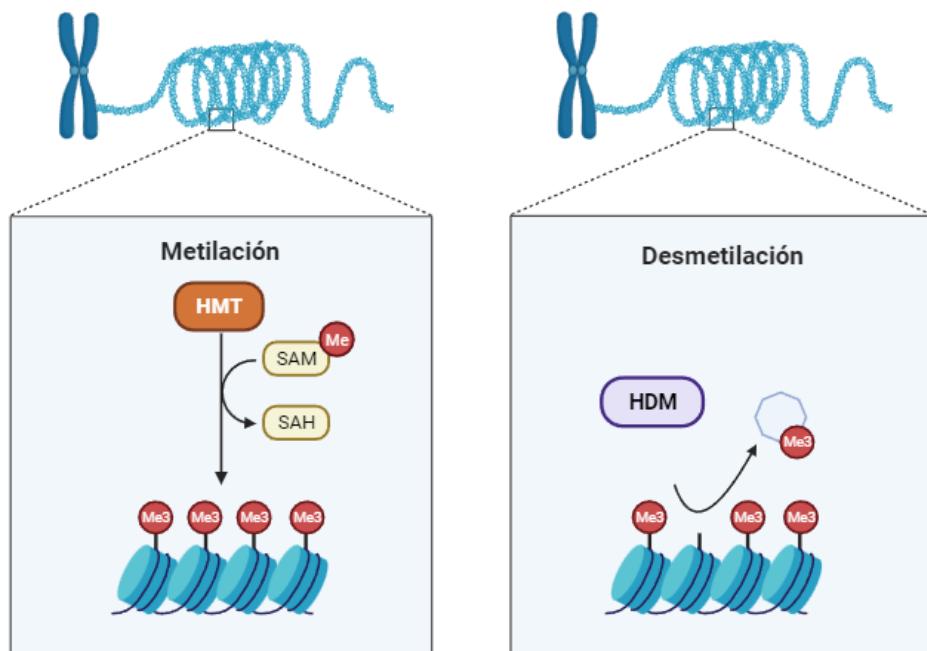


Figura 1. Esquema de las reacciones de metilación y desmetilación de histonas. Reacción de adición enzimática de un grupo metilo (A), y eliminación de éste (B) en residuos de histonas. Creado con *BioRender*.

2.1.2 Patrones y distribución de H3K4me3 en células somáticas

El foco principal de esta memoria recae sobre el estudio de la trimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3). En células somáticas, la presencia de H3K4me3 generalmente se asocia a regiones activas del genoma, donde la transcripción de genes es más probable (Wang, Yuan y Xie, 2018). Específicamente, esta marca se localiza de forma restringida formando picos estrechos en regiones promotoras de genes transcripcionalmente activos. La localización de estos picos de H3K4me3 en el genoma se relaciona además con ciertas características de la secuencia de ADN: regiones cortas, enriquecidas en dinucleótidos CG, y con ausencia de metilación del ADN, como las denominadas islas CpG (*CpG islands*, CGI). Además, existe una interrelación de la presencia de H3K4me3 con la distribución de otras modificaciones postraduccionales de histona tales como H3K27me3, con la que existe una marcada exclusión mutua; o H3K27ac con la que comparte una distribución similar. Así, los diferentes patrones de

distribución de H3K4me3 y su enriquecimiento en determinados *loci* genómicos, tienen la capacidad de influir en la regulación de la expresión génica, la conformación de la cromatina y la distribución de otras marcas epigenéticas de gran importancia funcional (Hughes, Kelley y Klose, 2020).

Existen en total seis HMT que actúan sobre la histona 3 en mamíferos, las cuales se dividen en tres grupos según su similitud de secuencia y formación de complejos: el dominio SET contiene 1A/B (SETD1A/B), lisina metiltransferasa (KMT) que contiene 2A/B (KMT2A/B) y el último grupo KMT que contiene 3/4 (KMT3/4). Siendo SETD1 la responsable de la mayor parte de las modificaciones de H3K4me3. (Sha, Zhang y Fan, 2020).

2.2 Epigenoma del ovocito

Los organismos multicelulares contienen cientos de tipos de células somáticas diferentes, pero sólo las células germinales son capaces de dar lugar a la próxima generación, transmitiéndole su material genético y epigenético (Larson, 2023). Esta es una de las razones que convierte a al ovocito una célula única, siendo capaz de madurar completamente durante la ovogénesis hasta convertirse en un óvulo funcional listo para ser fertilizado (Gosden y Lee, 2010). Durante este proceso, las modificaciones postraduccionales en las histonas son depositadas *de novo* y de forma específica en el genoma del ovocito en crecimiento, de forma concomitante con la expresión de los genes relacionados con la ovogénesis. Estas marcas son cruciales para garantizar el correcto funcionamiento del ovocito, ya que la alteración de los niveles de marcas como H3K27me3 o H4K16ac, entre otras, se ha asociado con errores en la segregación meiótica y aumento de las aneuploidías en el ovocito (Ragazzini *et al.*, 2019) (Wang *et al.*, 2017). Además, los patrones de modificación de histona del ovocito aportan instrucciones que preparan al genoma para su activación posterior en el embrión (Yu *et al.*, 2017).

El estudio de las marcas epigenéticas que interfieren en la meiosis es crucial para comprender la biología reproductiva femenina. La meiosis comienza en el ovocito durante el periodo de desarrollo fetal. El ovocito entra en profase I, etapa en la que se desarrollan las fases de leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno, fase en la que se detiene y permanece hasta el inicio de cada ciclo estral. Durante esta pausa, el ovocito contiene un núcleo grande cubierto por una envoltura nuclear, conocida como vesícula germinal (del inglés *germinal vesicle*, GV). Tras la pubertad, el ovocito reanuda su crecimiento en respuesta a las hormonas luteinizantes (LH) durante cada ciclo estral. Debido a la LH se dan cambios como la condensación de la cromatina y la descomposición de las vesículas germinales (del inglés *germinal vesicle breakdown*, GVBD).

Después de la GVBD, los ovocitos entran en la etapa de metafase I, anafase I y telofase I en la que se produce la extrusión del primer cuerpo polar, finalizando así la primera meiosis. Poco después comienza la segunda meiosis y el ovocito (óvulo maduro) se detiene en la metafase II (MII) hasta la fecundación (Figura 2). (He et al., 2021). La arquitectura cromosómica del ovocito también difiere significativamente de la de otros tipos celulares. Durante las etapas finales del crecimiento del ovocito GV, la cromatina experimenta notables cambios conformacionales y funcionales. Estos cambios incluyen la transición desde un estado en el que la cromatina no rodea al nucleolo (*non-surrounded nucleoli*, NSN) a un estado en el que la cromatina forma un anillo más compacto alrededor del nucleolo (*surrounded nucleoli*, SN), y el silenciamiento transcripcional (Figura 2). (Hanna, Demond y Kelsey, 2018).

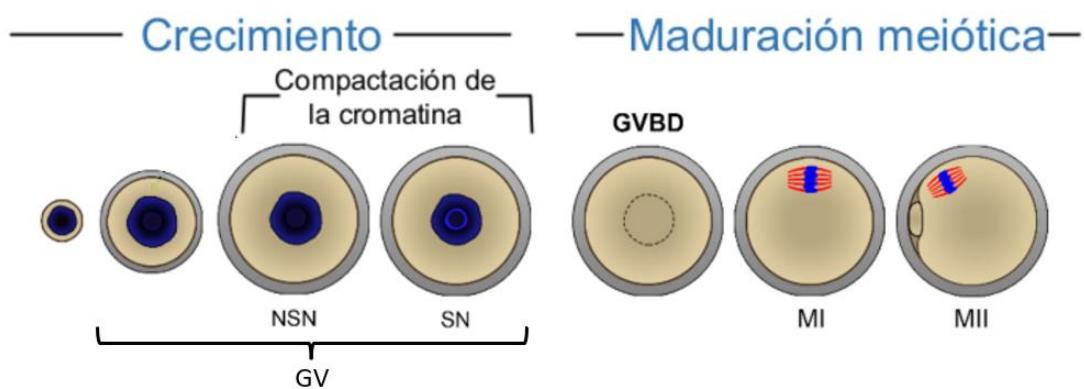


Figura 2. Fases de la ovogénesis: crecimiento y maduración meiótica. GV: vesícula germinal, GVBD: descomposición de las vesículas germinales, MI: metafase I, MII: metafase II, SN: cromatina rodeando al nucleolo, NSN: cromatina no rodeando al nucleolo.(Modificado de Christou-Kent et al., 2020).

2.2.1 Patrones y distribución de H3K4me3 en el ovocito

En la cromatina de los ovocitos se ha encontrado un patrón de distribución de H3K4me3 que difiere con el hallado en células somáticas. Esta forma no canónica de la marca de histona H3K4me3 (ncH3K4me3) se presenta como picos amplios que engloban regiones intergénicas, regiones distales génicas, e incluso promotores de genes transcripcionalmente inactivos (Figura 3; A y B). Además, se relaciona también con patrones no canónicos de otras marcas epigenéticas como la metilación del ADN, en la que H3K4me3 se asocia con regiones parcialmente metiladas. Difiere así con los picos agudos propios de H3K4me3 restringidos a regiones promotoras ricas en CpG que se observan en células somáticas (Figura 3; B) (Wu et al., 2022). La forma de presentación ncH3K4me3 se ha relacionado con el silenciamiento de genes en ovocitos. Además, de que la presencia generalizada de ncH3K4me3 coincide con el silenciamiento del genoma desde la maduración del ovocito hasta la fase inicial de dos células (Figura 3; C), la

inyección de la enzima desmetilasa de H3K4me3 KDM5B en ovocitos provoca un aumento de la transcripción en ovocitos GV (Zhang *et al.*, 2016). Estos hallazgos permiten proponer que la forma no canónica pueda contribuir a la represión génica, contrarrestando con la forma canónica que se asocia a la activación de genes. La presencia de diferencias en los patrones de señalización de H3K4me3 implica que la extrapolación de datos entre células somáticas y ovocitos no sea posible.

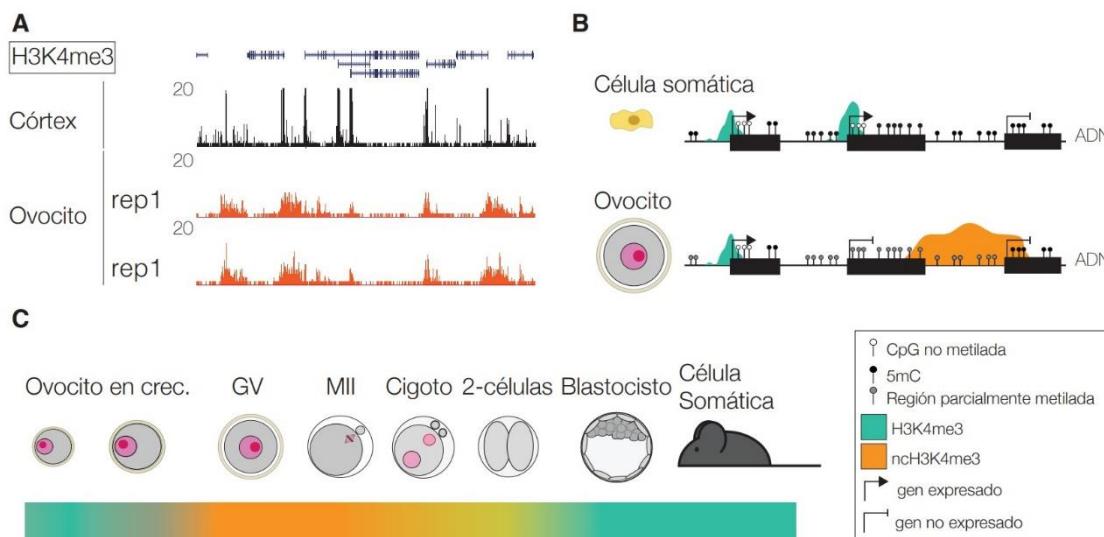


Figura 3. La distribución de H3K4me3 difiere en células somáticas y el ovocito. **A.** Visualización de datos de ChIP-seq de H3K4me3 de muestras de tejido somático (córtez) y ovocito (2 réplicas, rep.). La distribución genómica de H3K4me3 en córtez se presenta como picos muy definidos que coinciden con los promotores génicos, mientras que H3K4me3 presenta dominios extensos tanto en regiones génicas como intergénicas. Los genes se muestran con barras de color azul sobre los patrones de ChIP-seq. (Figura modificada de Zhang *et al.*, (2016)). **B.** Esquema de la distribución de H3K4me3 en células somáticas y ovocitos. En células somáticas H3K4me3 presenta un patrón canónico (verde) asociado a promotores con ADN no metilado de genes transcripcionalmente activos. En ovocitos se observan patrones canónicos (verde), y patrones ncH3K4me3, representados como un pico extenso (naranja) que engloba una región distal de un gen, regiones intergénicas enriquecidas en ADN parcialmente metilado, y genes no expresados. **C.** Representación simplificada de la presencia de patrones canónicos (verde) y no canónicos (naranja) de H3K4me3 a lo largo de la ovogénesis, desarrollo embrionario y animal adulto. (Figura modificada de Zhang *et al.*, (2016)).

2.3 Epigenética en el envejecimiento

El envejecimiento se puede definir como la declinación crónica y gradual de las capacidades funcionales a nivel celular y tisular. Una vez el organismo alcanza su máxima fertilidad y vigor, inicia su proceso de envejecimiento (Wang, Yuan y Xie, 2018). Las alteraciones epigenéticas pueden considerarse marcadores distintivos del envejecimiento, ya que actúan como una interfaz para recibir y memorizar señales del entorno, condicionando la expresión génica heredable y programada (Wu et al., 2022). El estudio de estas alteraciones da lugar al desarrollo de la rama de investigación conocida como “epigenética del envejecimiento”. (Wang, Yuan y Xie, 2018).

En las células somáticas, se han observado evidencias de la presencia de cambios globales en los niveles de metilación de histonas durante el proceso de envejecimiento. Una de las explicaciones que respaldan esta relación es la identificación de enzimas HMT y HDM que influyen en la esperanza de vida de los organismos (McCauley y Dang, 2014). Ejemplos de la influencia de estas enzimas son, cómo la deficiencia de ASH-2, WDR-5 y SET-2, enzimas HMT que metilan H3K4, prolongan la vida útil de *Caenorhabditis elegans*, mientras que por el contrario, la H3K4 desmetilasa RBR-2 es necesaria para tener la vida útil esperada en esta especie (Greer et al., 2010). En segundo lugar, a pesar de la presencia de datos contradictorios entre diferentes sistemas que requiere resolución, se observa una tendencia global de aumento de marcas “activadoras” de histonas (H3K4me2/3, H3K36me3) y una disminución de marcas “represivas” (H3K27me3, H3K9me2/3). Esto indica una mayor actividad transcripcional en un genoma eucromático (cromatina menos compacta y más accesible), lo cual concuerda con observaciones previas de una conformación abierta de la cromatina en células de organismos envejecidos (McCauley y Dang, 2014). En tercer lugar, las marcas de histona no sólo se modifican a nivel global en el envejecimiento. Estudios en líneas celulares somáticas en las especies ratón y humanas muestran también una re-distribución de las marcas de metilación de histonas con aparición de patrones aberrantes a lo largo del genoma, tales como la aparición de dominios bivalentes marcados por modificaciones de histonas activadoras y represivas (H3K4me3 y H3K27me3) (Jirtle y Skinner, 2007). (Michalak et al., 2019) .

A pesar de contar con estudios que demuestran la relación existente entre la metilación de histonas y el envejecimiento, y de observar alteraciones en la distribución de ciertas histonas metiladas en el genoma, los mecanismos subyacentes que llevan a estos cambios y su impacto específico en el envejecimiento aún son un enigma (McCauley y Dang, 2014). Es importante tratar de responder a la pregunta de si la distribución de estas alteraciones dadas en

envejecimiento y si la metilación o desmetilación de histonas está vinculada a regiones transcripcionalmente activas o reprimidas, porque su respuesta puede ayudar a proveer la activación o desactivación de numerosos genes que, en conjunto, contribuyen al envejecimiento o a enfermedades asociadas al envejecimiento, como el cáncer. Además, el papel de la metilación de ciertos residuos de histonas en la reparación del ADN y el mantenimiento de dominios de heterocromatina, como los telómeros y los centrómeros, sugiere que un conjunto adecuado de marcas de metilación de histonas podría contribuir a prevenir la inestabilidad genómica (Clouaire et al., 2012).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La epigenética desempeña un papel crucial en la regulación y adaptación de los organismos al entorno, influyendo en el desarrollo, la salud y la herencia de generación en generación. Su importancia transciende a muchos campos de estudio, entre ellos la reproducción femenina. Comprender la epigenética en ovocitos es fundamental para abordar cuestiones relacionadas con la fertilidad, el desarrollo embrionario y la salud de la descendencia. Una de las modificaciones epigenéticas que se ha estudiado en ovocitos y se ha relacionado con alteraciones asociadas con el envejecimiento ha sido H3K4me3. Esta marca de metilación de histona presenta patrones de distribución diferentes en células somáticas y ovocitos, lo que constituye un desafío para su estudio, ya que impide la extrapolación directa de los resultados obtenidos en células somáticas a ovocitos. La solución podría ser aplicar técnicas similares a las utilizadas en células somáticas a los ovocitos para obtener la misma información. Sin embargo, los experimentos con ovocitos presentan dificultades en su obtención y manejo, lo que complica el estudio de H3K4me3 en estas células. Por estas razones se han planteado los siguientes objetivos:

- 1) Realizar una revisión de las técnicas utilizadas en ovocitos para el estudio de alteraciones epigenéticas, analizando sus aplicaciones y limitaciones, y recopilar la información existente sobre la tendencia de H3K4me3 en el envejecimiento de ovocitos GV de mamíferos.
- 2) Adaptar un método experimental para analizar H3K4me3 en número limitado de células para aplicarlo en el futuro a estudios de envejecimiento en ovocitos usando el anticuerpo testado previamente.
- 3) Cuantificar H3K4me3 en ovocitos de ratones jóvenes respecto a viejas mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta para analizar su tendencia en el envejecimiento.

A largo plazo, este trabajo tiene como objetivo establecer la base para una futura investigación más amplia sobre la tendencia de H3K4me3 en el envejecimiento en ovocitos murinos y humanos y los genes vinculados a esta modificación.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda bibliográfica sistemática utilizando las bases de datos de *PubMed*, *Web of Science*, *ScienceDirect* y *Scholar Google*, además de revistas *online* como *Nature Reviews*. Las palabras clave que han facilitado la búsqueda de información fueron “*Aging*” “*Epigenetic*” “*Mammalian oocyte*” “*histone modifications*” y “*H3K4me3*”. Se limitó la búsqueda de las modificaciones epigenéticas en metilación y acetilación de histonas en ovocitos GV. No se puso limitaciones en la fecha de publicación para abarcar todos los artículos publicados hasta la fecha.

Cultivo celular

Tras la descongelación de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), se centrifugaron y resuspendieron en medio MEF (DMEM alto en glucosa, 10% suero fetal bovino, 1 mM piruvato de sodio, 50 unidades/mL penicilina y 50 µg/mL estreptomicina) y se sembraron en placas de cultivo celular de 150 mm. Al alcanzar confluencia, tras 1-2 días de incubación a 37 °C con 5% de CO₂, se realizó la resiembra en nuevas placas. Este procedimiento implicó lavado con PBS, tratamiento con tripsina al 0.25%, resuspensión en medio MEF, y siembra en nuevas placas.

“Corte y liberación bajo objetivos utilizando mediante el uso de una nucleasa” (*Cleavage Under Targets and Release Using Nuclease, Cut&Run*)

Preparación de las células

El protocolo de *Cut&Run* fue modificado de Skene y Henikoff, (2017) . Se resuspendieron 20 µL de perlas magnéticas de concanavalina A por muestra en tampón de unión (TU; HEPES-KOH pH 7.6 20 mM, KCl 10mM, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM). Las perlas se lavaron dos veces en TU y se resuspendieron en 150 µL de TU por muestra. Las células MEFs se contaron mediante el uso de la cámara de Neubauer y posteriormente diluyeron en PBS a la concentración de interés para cada muestra. Se centrifugaron las células para eliminar el PBS y se resuspendieron en 300 µL de un tampón de extracción nuclear (HEPES-KOH pH 7.6 20 mM, KCl 10mM, espermidina 0.5 mM, Tritón al 0.1%, glicerol al 20% , inhibidores de proteasa 1X) e incubaron 5 minutos en hielo. A continuación, se agregaron las perlas resuspendidas en TU a la solución celular, y se incubaron

10 minutos en rotación a temperatura ambiente para permitir la unión del núcleo de las células a las perlas. En el resto de pasos, se utilizó un imán para recuperar los núcleos celulares unidos a las perlas magnéticas y permitir los lavados y cambios de solución.

Unión del anticuerpo primario

Los conjuntos de núcleos-perlas se bloquearon con 1mL de tampón de bloqueo (HEPES 20mM, NaCl 150 mM, espermidina 0.5 mM, BSA al 0,1%, 2 mM EDTA e inhibidores de proteasa 1X), se homogeneizaron mediante rotación, y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se incubaron los núcleos-perlas de las muestras de estudio con una solución de anticuerpo primario RαH3K4me3 (Upstate®, Merck, referencia 07-473) a dilución 1:100 en tampón de lavado (TL) (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, espermidina 0.5 mM, BSA al 0,1%, inhibidores de proteasa 1X). La muestra de control negativo se incubó con inmunoglobulina G (IgG) (Mouse anti-IgG, referencia A-4416 Sigma) a igual dilución. Las muestras se incubaron durante 2 horas y 30 minutos a 4 °C en rotación. Se descartó el sobrenadante y las muestras se resuspendieron en 200 µL de TL.

Unión y escisión usando el complejo proteína A-nucleasa microcócica (pA-MNasa)

Las muestras se incubaron después durante 1 hora, en rotación a 4 °C, con pA-MNasa a una concentración final de 1:400 en TL . Tras dos lavados en TL, las muestras se equilibraron a 0 °C durante 5 minutos. Para iniciar la escisión del ADN, se agregó 3 µL de CaCl₂ 100 mM a las muestras y se incubaron en frío 30 minutos. Pasado ese tiempo, se añadió 300 µL de un tampón encargado de detener la digestión (NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, EGTA 2 mM, 25 µg/ml de ARNasaA, 20 µg/mL de glicógeno, 0.05% NP40). Tras una incubación a 37 °C y una centrifugación en frío (16000rpm, 5 minutos), los sobrenadantes que contenían los fragmentos de ADN de interés, ya libres de las perlas, se transfirieron a microtubos limpios.

Extracción del ADN

Tras la adición de 5 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y 3 µL de SDS al 10% para favorecer la desnaturalización de las proteínas, las muestras se mezclaron por inversión y se incubaron a 70 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se purificó el ADN mediante extracción con fenol/cloroformo, seguida de extracción con cloroformo, y se precipitó en frío con 0,5 µL de glicógeno (20 mg/mL) y etanol al 100%. Tras la centrifugación a 16.000 rpm a 4 °C y lavado del

pellet con etanol al 85%, el ADN se resuspendió en 40 µL de Tris-EDTA (Tris-HCL 1mM pH8 y EDTA 0,1 mM).

Librerías

Se realizaron librerías de todas las muestras *Cut&Run* según las instrucciones del fabricante (Accel-NGS 2S PLUS DNA, Swift biosciences). Mediante cuatro incubaciones, este protocolo repara los extremos 5' y 3' de los fragmentos de ADNbc y une sucesivamente secuencias de adaptadores de Illumina a estos. Se utilizó el kit 2S SetA (Swift biosciences) para la indexación única.

Electroforesis capilar

La medida del tamaño de los fragmentos de ADN eluidos de los ensayos *Cut&Run*, así como una estimación de la concentración de estos, se llevó a cabo mediante electroforesis capilar de las muestras en un equipo TapeStation (Agilent) usando el kit High Sensitivity D1000 y siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Para el ensayo se preparó una escalera de tamaño de ADN proporcionada con el kit, así como 2 µL de cada muestra *Cut&Run*. Los perfiles de distribución de tamaño de fragmentos de ADN se evaluaron posteriormente en el software de análisis de *TapeStation*.

Recuperación de ovocitos en estadio GV

Los ratones usados en los ensayos de inmunofluorescencia proceden de la línea C57BL/6. Los procedimientos se llevaron a cabo bajo las Licencias de Proyecto PI11/12 y PI25/09 aprobadas por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. Los animales fueron cuidados y usados de acuerdo con la Política Española de Protección Animal RD1201/05, que cumple con la Directiva de la Unión Europea 86/609 en la protección de animales usados para experimentación y otros fines científicos.

Los ovocitos GV se aislaron de ratones hembra jóvenes (3,3 semanas) y de ratones hembra viejas (22,1 semanas). El medio usado para el aislamiento y lavado de los ovocitos fue de M2-0,4% BSA con milrinona a la concentración de 1 µM, la cual se usó para inhibir el desarrollo de la meiosis de los ovocitos una vez aislados del ovario. Mediante el uso del binocular, se aisló de forma mecánica la mayor cantidad de ovocitos posibles realizando repetidos cortes en los ovarios con hojas de bisturí. Después se seleccionaron aquellos ovocitos que presentaban las características de ovocitos GV completamente desarrollados: vesícula germinal centrada, ooplasma

translúcido, gran diámetro y zona pelúcida gruesa. A continuación, se realizaron varias aspiraciones y eyeciones de los ovocitos en sucesivas gotas de lavado con medio M2-0,4% BSA-milrinona para eliminar todas las células foliculares circundantes.

Fijación e inmunofluorescencia de ovocitos

Todos los pasos de lavado se realizaron en portaobjetos excavados y con un volumen de medio de 150 µL. La solución de lavado fue 1% PBS/BSA con 0,1% Tritón excepto cuando se indique específicamente. Los ovocitos previamente aislados se transfirieron a un medio libre de calcio y proteínas (*phosphate buffered saline, PBS*) donde se dejaron reposar 5 minutos. Posteriormente, los ovocitos fueron fijados durante 20 minutos a temperatura ambiente con una solución de paraformaldehído al 2.5% en PBS (pH 7,4), y se almacenaron en una cámara húmeda a 4 °C en solución de lavado. Al día siguiente, los ovocitos fueron permeabilizados durante 30 minutos en una solución de 1% PBS/BSA con 0,5% Tritón, seguido por tres lavados de 5 minutos cada uno con solución de lavado, todo llevado a cabo a temperatura ambiente. Posteriormente, los ovocitos se incubaron a 4 °C durante toda la noche con el anticuerpo primario *RabbitαH3K4me3* (RaH3K4me3, dilución 1:200, Upstate®, Merck, referencia 07-473), excepto en la muestra control negativo, en la que no se añadió anticuerpo primario. A la mañana siguiente, se realizaron tres lavados de 15 minutos a temperatura ambiente en solución de lavado para eliminar el anticuerpo primario sobrante, y se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario *GoatαRabbitA488* (GaR488, dilución 4 µg/mL, referencia A 11008 Invitrogen) en solución de lavado durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizó un lavado de 5 minutos a temperatura ambiente en solución de lavado, y seguidamente se incubaron durante 15 minutos en una dilución con DAPI (1:50) en PBS a temperatura ambiente y en oscuridad para la tinción del ADN. Nuevamente, se realizó un lavado de 15 minutos a temperatura ambiente en solución de lavado. Para finalizar, se realizaron varios pasos seriados de las muestras de ovocitos en concentraciones crecientes de glicerol diluido en PBS/2% BSA (glicerol al 2,5% (5'), 5% (5'), 10% (10'), 20% (15'), y 50% (15')), para permitir una inclusión adecuada de los ovocitos en medio de montaje sin ningún colapso ni cambio morfológico de los mismos. Los ovocitos se montaron en portaobjetos con solución de montaje DTG (2,5% DABCO, 50mM Tris pH 8.6 y 90% glicerol). Las muestras se conservaron a 4 °C en una caja opaca para preservar la fluorescencia, para su posterior análisis en el microscopio confocal.

Imagen confocal y análisis de imagen

Las imágenes de los ovocitos fueron adquiridas con un microscopio confocal Zeiss - LSM 880. Las imágenes fueron tomadas con una resolución de 1024 por 1024 píxeles, utilizando un objetivo de 63x, y usando los mismos parámetros de potencia de láser para todas las muestras. Se analizó todo el núcleo de cada ovocito a lo largo del eje Z, usando una distancia entre secciones optimizada por el software del confocal. La cuantificación se realizó posteriormente utilizando el software de análisis de imagen Image J2 Fiji (versión: 2.14.0/1.54f). Para la cuantificación se llevó a cabo primero una reconstrucción de los núcleos en 3D, y una segmentación basándose en la intensidad de los pixeles del canal que correspondía a la tinción con DAPI. En segundo lugar, se realizó la extracción de los valores de intensidad de señal de los pixeles de los canales que correspondían tanto a DAPI como a H3K4me3. En ningún caso se aplicaron modificaciones o límites de intensidad en ninguno de los canales o imágenes analizadas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de la intensidad media de la fluorescencia fue llevado a cabo mediante el empleo del software SPSS (IBM SPSS Statistics, Versión 26.0). La significancia estadística se estableció en un valor de $p < 0.05$ para todos los análisis.

Tras evaluar la distribución de las muestras mediante el test de Shapiro-Wilks (aplicable a conjuntos de datos menores de 30), se aplicaron distintos métodos. Para muestras con distribución normal, se utilizó el test de T de Student (muestras independientes) comparando las medias de los ovocitos más/menos la desviación estándar, verificando la homogeneidad de varianzas con el análisis de varianza de Levene (Anexos). En el caso de muestras con distribución no normal, se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney comparando las medianas de los ovocitos más/menos la desviación estándar (Anexos).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudio de las modificaciones postraduccionales de histona en el envejecimiento del ovocito

Desde el reconocimiento de las marcas epigenéticas en el ADN y la cromatina como factores importantes en la maduración de los ovocitos, ha aumentado el interés por la epigenética de esta célula y en el desarrollo de nuevas técnicas para su estudio. (Wu et al., 2022). Las técnicas más comunes para estudiar este comportamiento en el ovocito de mamífero son la

inmunofluorescencia y *Western blot*, que nos permiten analizar la cantidad de las modificaciones de histona. (Hanna, Demond y Kelsey, 2018). Estas técnicas se han empleado para examinar las modificaciones en las histonas vinculadas al proceso de envejecimiento, proporcionando una comprensión más profunda sobre la evolución de ciertas marcas epigenéticas a lo largo del tiempo. En este contexto, la acetilación y la metilación destacan como las dos modificaciones epigenéticas mejor caracterizadas en histonas asociadas con el envejecimiento (Wang, Yuan y Xie, 2018).

La tabla 1 muestra una recopilación de los estudios que han analizado las posibles alteraciones de las modificaciones de acetilación y metilación de histonas asociadas al envejecimiento en ovocitos de mamíferos en estadio GV. Sólo se han encontrado resultados en ovocitos de ratón y de humano. En primer lugar (Tabla 1; A) , se puede observar una tendencia general a la disminución de metilación de histonas en ovocitos GV viejos respecto a jóvenes (H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3, H3K36me2, H3K79me2, H4K20me2), exceptuando H3K4me1 que no presenta cambios con la edad. Es interesante resaltar, que los datos referidos a las marcas de metilación (di y tri-metilación) de la lisina 4 (H3K4me2 y H3K4me3, respectivamente) y H3K9me2 muestran resultados contradictorios en estudios diferentes, ya que se ha observado tanto una disminución significativa de las marcas como una ausencia de cambio significativo entre ovocitos GV de ovocitos viejos y jóvenes. En segundo lugar, se muestra la tendencia durante el envejecimiento de marcas de acetilación de histonas en ovocitos GV (Tabla 1; B). A diferencia de la disminución generalizada observada en la mayoría de las marcas de metilación de histona, observamos alteraciones de diferente sentido en relación con las marcas de acetilación de histonas. Mientras que ciertas marcas de acetilación como H3K9ac, H4K12ac, y H4K16ac disminuyen en ovocitos GV en el envejecimiento, se ha registrado también un aumento asociado a la edad de la marca H4K5ac en ovocitos GV envejecidos. Este último resultado no es concluyente, ya que otro estudio presenta la ausencia de cambios significativos en H4K5ac. H4K8ac no muestra cambios significativos asociados al envejecimiento. Aún es discutible si estas alteraciones son factores desencadenantes o resultados del proceso de envejecimiento, aunque está ampliamente aceptado que existe cierta conexión entre ambos (Wang, Yuan y Xie, 2018).

Tabla 1. Marcas de metilación (A.) y acetilación (B.) en residuos de histona en ovocitos GV y su tendencia con el envejecimiento.

A) Metilación de histonas

	TENDENCIA	ESPECIES	EDAD		TÉCNICA	REFERENCIA
			Joven	Vieja		
<i>H3K4me1</i>	N.C	Ratón	6-8 semanas	42-44 semanas	Inmunofluorescencia	(Shao <i>et al.</i> , 2015)
<i>H3K4me2</i>	N.C	Ratón	2 meses	11 meses	Inmunofluorescencia	(Manosalva y González, 2010)*
			↓	6-8 semanas	42-44 semanas	Inmunofluorescencia
<i>H3K4me3</i>	N.C	Ratón	2 meses	9 meses	Inmunofluorescencia	(Wasserzug-Pash <i>et al.</i> , 2022)
			6-8 semanas	42-44 semanas	Inmunofluorescencia	(Shao <i>et al.</i> , 2015)
	↓	Ratón	4 semanas	14 meses	Inmunofluorescencia y <i>Western blot</i>	(Wu <i>et al.</i> , 2022)*
		Humana	< 35 años	> 35 años	Inmunofluorescencia	(Wu <i>et al.</i> , 2022)*
<i>H3K9me2</i>	N.C	Ratón	2 meses	11 meses	Inmunofluorescencia	(Manosalva y González, 2010)*
	↓	Ratón	2 meses	9 meses	Inmunofluorescencia	(Wasserzug-Pash <i>et al.</i> , 2022)
			10-13 semanas	69-70 semanas	Inmunofluorescencia	(Marshall <i>et al.</i> , 2018)
		Humana	< 35 años	> 35 años	Inmunofluorescencia	(Wasserzug-Pash <i>et al.</i> , 2022)
<i>H3K9me3</i>	↓	Ratón	2 meses	11 meses	Inmunofluorescencia	(Manosalva y González, 2010)*
<i>H3K27me3</i>	↓	Ratón	2 meses	9 meses	Inmunofluorescencia	(Wasserzug-Pash <i>et al.</i> , 2022)
<i>H3K36me2</i>	↓	Ratón	2 meses	11 meses	Inmunofluorescencia	(Manosalva y González, 2010)*
<i>H3K79me2</i>	↓	Ratón	2 meses	11 meses	Inmunofluorescencia	(Manosalva y González, 2010)*
<i>H4K20me2</i>	↓	Ratón	2 meses	11 meses	Inmunofluorescencia	(Manosalva y González, 2010)*

B) Acetilación de histonas

	TENDENCIA	ESPECIES	EDAD		TÉCNICA	REFERENCIA
			Joven	Vieja		
H3K9ac	↓	Ratón	10-13 semanas	69-70 semanas	Inmunofluorescencia	(Marshall <i>et al.</i> , 2018)
H4K5ac	NC	Ratón	2 meses	10-11 meses	Inmunofluorescencia	(Manosalva y González, 2009) *
	↑	Ratón	10- 13 semanas	67-70 semanas	Inmunofluorescencia	(Marshall <i>et al.</i> , 2018)
H4K8ac	NC	Ratón	8 semanas	40-44 semanas	Inmunofluorescencia	(Manosalva and González, 2009)35
H4K12ac	↓	Ratón	3 semanas	40 semanas	Inmunofluorescencia	(Akiyama <i>et al.</i> , 2006)
			2 meses	10-11 meses	Inmunofluorescencia	(Manosalva and González, 2009) *
H4K16ac	↓	Ratón	8 semanas	40-44 semanas	Inmunofluorescencia	(Manosalva and González, 2009) *

↓, disminuye la marca epigenética de ovocito joven a viejo. ↑, aumenta la marca epigenética de ovocito joven a viejo. NC, no se observan cambios. *, Publicaciones que han realizados los análisis de datos dividiendo los ovocitos en SN y NSN.

Algunos de estos estudios han ido un paso más allá y han clasificado los ovocitos GV según la conformación de la cromatina, es decir, en SN o NSN (Tabla 1; REFERENCIA*). Por ejemplo, Manosalva y González, (2010) en un primer análisis obtuvieron como resultado la ausencia de cambios significativos en los niveles de H3K4me2 y H3K9me2 entre ovocitos jóvenes y ovocitos viejos. Sin embargo, al realizar una reevaluación y analizar su comportamiento en SN y NSN por separado, se encontró una disminución significativa de H3K9me3 en ovocitos NSN viejos respecto a ovocitos NSN jóvenes, mientras que en ovocitos SN no se observaron cambios con el envejecimiento. Estos mismos investigadores realizaron un estudio reevaluando también los niveles de acetilación de histonas en los ovocitos GV en función de la configuración de la cromatina. En este estudio observaron cómo había una disminución de H4K8ac significativa específicamente en ovocitos SN viejos, y como en ovocitos NSN viejos había un aumento significativo de H4K5ac y H4K12ac respecto a sus niveles en ovocitos jóvenes. Este último resultado en los niveles de H4K12ac llama especialmente la atención debido a que al analizar sus niveles en todos los ovocitos en conjunto observaron una disminución de la marca en el envejecimiento. Por lo tanto, al analizar de forma independiente los niveles de modificaciones de histonas de muestras de ovocitos con conformación SN y NSN, observaron que algunas marcas de histona no mostraban la misma tendencia en el envejecimiento que al evaluar todos los ovocitos GV en conjunto (Manosalva y González, 2009).

En resumen, aunque siendo la acetilación y metilación de histonas las modificaciones de histona más investigadas, existe un número limitado de publicaciones sobre cómo éstas evolucionan a lo largo de los años en ovocitos GV, se han reportado además datos de sólo dos especies (humana y ratón, únicamente), y existen contradicciones entre estudios. Además, varios investigadores en sus estudios no tienen en cuenta en qué configuración se encuentra la cromatina del ovocito GV, y esta valoración podría resultar de utilidad, porque conocer la presencia de las marcas epigenéticas en ovocitos SN y NSN podría ayudar a conocer más acerca de su comportamiento durante el envejecimiento, su tendencia a activar o reprimir el genoma y su influencia en ciertas alteraciones en el ovocito.

En este mismo área de conocimiento, numerosas estrategias metodológicas han tratado de cuantificar con precisión y de determinar la distribución de las modificaciones de histonas a lo largo del genoma mediante el uso de anticuerpos para la inmunoprecipitación de cromatina (*Chromatin Immunoprecipitation*, ChIP) seguido de amplificación y secuenciación del ADN asociado (ChIP-seq). Los últimos enfoques basados en secuenciación han revolucionado nuestra capacidad de perfilar la información epigenética ya que, hasta hace poco, era inviable obtener mapas genómicos de alta resolución sin la necesidad de usar millones de células como material de partida. Recientemente, sin embargo, se han publicado nuevos modos de obtener y amplificar el material genético que han hecho posible reducir enormemente el número de células necesarias, permitiendo llegar en algunas de estas adaptaciones técnicas del ChIP-seq o el protocolo *Cut&Run* hasta el uso de sólo 400-1.000 células y 100 células, respectivamente (Hanna, Demond y Kelsey, 2018).

Descubrir nuevas técnicas eficaces que no requieran una gran cantidad de células en el campo de la epigenética del envejecimiento en ovocitos supone una gran avance, debido a que existe un factor que delimita su estudio; los propios ovocitos. Realizar estudios en ovocitos trae consigo una serie de dificultades que no se encuentran en el estudio de células somáticas como, por ejemplo, la dificultad de aislarlos en grandes cantidades. El método de recolección más extendido implica extraer los ovarios, realizar cortes o punciones en el tejido, y aspirar las células con una pipeta bucal para recoger individualmente cada ovocito. Este procedimiento requiere una manipulación delicada, formación previa, y consume mucho tiempo. Un inconveniente adicional es el número de ovocitos necesarios para la investigación, ya que el número de ovocitos que se extraen por cada hembra son limitados. Además, la edad del animal afecta a los estudios de envejecimiento, reduciéndose el número de ovocitos que se pueden recuperar de hembras viejas. Adicionalmente al hecho de que la hembra ya nace con toda la dotación de

ovocitos que va a presentar a lo largo de su vida – no hay procesos de multiplicación celular post-natales en la ovogénesis-, existe una marcada atresia folicular de carácter fisiológico con su consecuente pérdida de ovocitos, a la que se restan todos los ovocitos que se ovulan una vez iniciada la pubertad (Stewart *et al.*, 2015). La ventaja que se puede sacar de la ausencia de división celular es que este tipo de células pueden actuar como una memoria que ayuda a recopilar todas las modificaciones celulares asociadas con la edad (Wu *et al.*, 2022). En definitiva, se requieren un número muy elevado de ratones hembra y una gran cantidad de tiempo y formación para recolectar la muestra de células necesarias para realizar una técnica tan extendida como podría ser ChIP-seq (Stewart *et al.*, 2015). Otro aspecto a mencionar, es la complejidad del manejo del ovocito en las distintas etapas del desarrollo y las dificultades que genera la maduración asincrónica para un estudio, debido a que los ovocitos en distintas etapas de maduración pueden responder de manera diferente a las condiciones del laboratorio, teniendo que adaptar el protocolo a cada estado de maduración (Moghadam *et al.*, 2022). Finalmente mencionar los problemas éticos y legales que genera la obtención de ovocitos para la investigación, especialmente si se obtienen de donantes humanos. Los investigadores deben seguir pautas éticas estrictas y obtener el consentimiento adecuado (Lucea y Martínez, 2012). Para ser capaces de superar estos desafíos, las líneas de investigación siguen abordando estas dificultades para comprender mejor los mecanismos subyacentes al envejecimiento de los ovocitos.

5.2 Adaptación de un método de estudio para analizar diferencias de H3K4me3 en el envejecimiento de ovocitos

La identificación de la ubicación específica de las marcas epigenéticas a lo largo del genoma resulta fundamental para comprender su función en los ovocitos. Aunque es evidente que estas marcas desempeñan un papel significativo en los procesos nucleares esenciales, la demostración experimental de un vínculo causal directo es un desafío. (Michalak *et al.*, 2019). Por estas razones son muchos los investigadores que trabajan para conocer mejor las interacciones entre el ADN y las histonas, resultando ser la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) la técnica por excelencia desde hace 30 años. El ChIP es un método que permite analizar las interacciones de proteínas con el ADN o la distribución de modificaciones de histona en el genoma, y requiere de la fragmentación física de la cromatina y la selección y captura de fragmentos de cromatina unidos proteínas o marcas de interés mediante su unión a anticuerpos específicos. Sin embargo, es un método que involucra un gran número de células de entrada, relaciones señal-ruido bajas y la necesidad de generar un enlace cruzado ADN-proteína que puede propiciar el

enmascaramiento de epítopos y dar lugar a resultados falsos positivos (Akdogan-Ozdilek et al., 2022). Aunque el método de ChIP seguido de secuenciación se ha adaptado a un número más reducido de células (400–1.000 células iniciales), los resultados obtenidos siguen siendo intrínsecamente ruidosos (Hanna, Demond y Kelsey, 2018). Recientemente fue publicada la técnica *Cut&Run* como alternativa al ChIP. El *Cut&Run* se diferencia del ChIP en que no requiere de la fragmentación inicial de todo el genoma. Así, se basa en el uso de la combinación de la nucleasa microcócica y proteína A/G (pAG-MNasa) en células permeabilizadas no fijadas, de forma que la enzima corta de manera selectiva la cromatina unida a anticuerpos reconocidos por la proteína A/G permitiendo eluir únicamente los fragmentos de ADN de interés. Al liberar únicamente la fracción del genoma que hemos cortado específicamente, *Cut&Run* reduce el ADN eluído de forma inespecífica minimizando los problemas de señal-ruido, y también reduce el número necesario de células usado como material de partida (hasta 1/1000 de las requeridas en ChIP tradicionales) (Akdogan-Ozdilek et al., 2022).

En ese trabajo, se busca optimizar el protocolo de *Cut&Run* utilizando un número inicial reducido de células somáticas, con el objetivo de aplicarlo posteriormente al estudio de H3K4me3 en ovocitos. Resumiendo, el protocolo descrito en material y métodos, primero se permeabilizaron células MEFs no fijadas con Triton X-100 y se inmovilizaron en perlas magnéticas para facilitar cambios eficientes de solución. A continuación, se unieron el anticuerpo R α H3K4me3 y la pA-MNasa a H3K4me3 a lo largo del genoma. La enzima MNasa micrococcal es estrictamente dependiente del ión Ca²⁺, así, tras añadir Ca²⁺, la MNasa escindió el ADN que flanqueaban los nucleosomas unidos a H3K4me3. Esto se realizó a 0°C para limitar la actividad de la enzima y reducir el corte inespecífico, reduciendo así el ruido. Sólo los fragmentos de cromatina con escisiones en ambos lados de los nucleosomas difundieron fuera del núcleo y se eluyeron al sobrenadante, por tanto, al extraer el sobrenadante se obtuvieron fragmentos específicos de ADN marcados por H3K4me3 (Figura 3). Estos fragmentos se amplificaron posteriormente mediante la generación de una librería Ilumina y se analizaron por electroforesis capilar con *TapeStation*. Al mismo tiempo se realizó en paralelo un control negativo usando IgG, para cuantificar el ADN eluído de forma inespecífica en esta técnica.

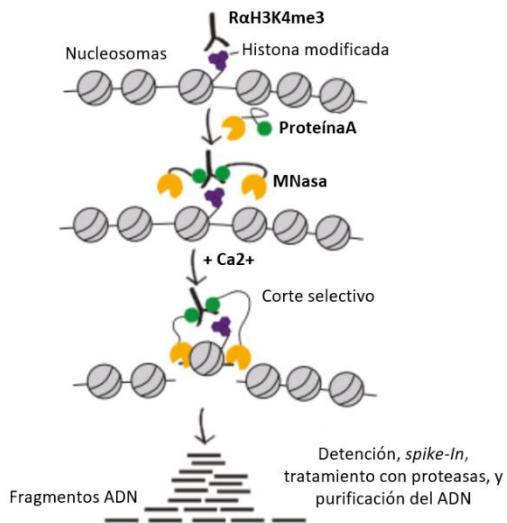


Figura 3. Esquema de la técnica *Cut&Run*.

Así, se realizó una titulación del número de células necesarias como material de partida en la técnica *Cut&Run*. Se procesaron cinco muestras en paralelo: cuatro de ellas que contenían 100.000, 10.000, 1.000 y 100 células MEFs, respectivamente, se procesaron con el anticuerpo específico para H3K4me3; la quinta muestra se utilizó como control de especificidad usando IgG en una cantidad de material de partida de 100.000 células (Tabla 2).

Tabla 2. Muestras utilizadas en *Cut&Run*. Especificaciones (nombre asignado, número de células MEFs iniciales, anticuerpo empleado) de las muestras objetivo.

Muestra	N.º Células MEFs	Anticuerpo
C1	100.000	IgG
C2	100.000	RαH3K4me3
C3	10.000	RαH3K4me3
C4	1.000	RαH3K4me3
C5	100	RαH3K4me3
A	-	-

Posteriormente se evaluó la distribución del tamaño de los fragmentos obtenidos en las imágenes de electroforesis capilar comparando las muestras a estudiar con una muestra “escalera”, que contiene una serie de fragmentos de ADN de distintos tamaños conocidos y se utiliza como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos desconocidos del resto de muestras. Además, se agregó una muestra de agua para poder comparar con una muestra sin fragmentos de ADN (Figura 4; A y B).

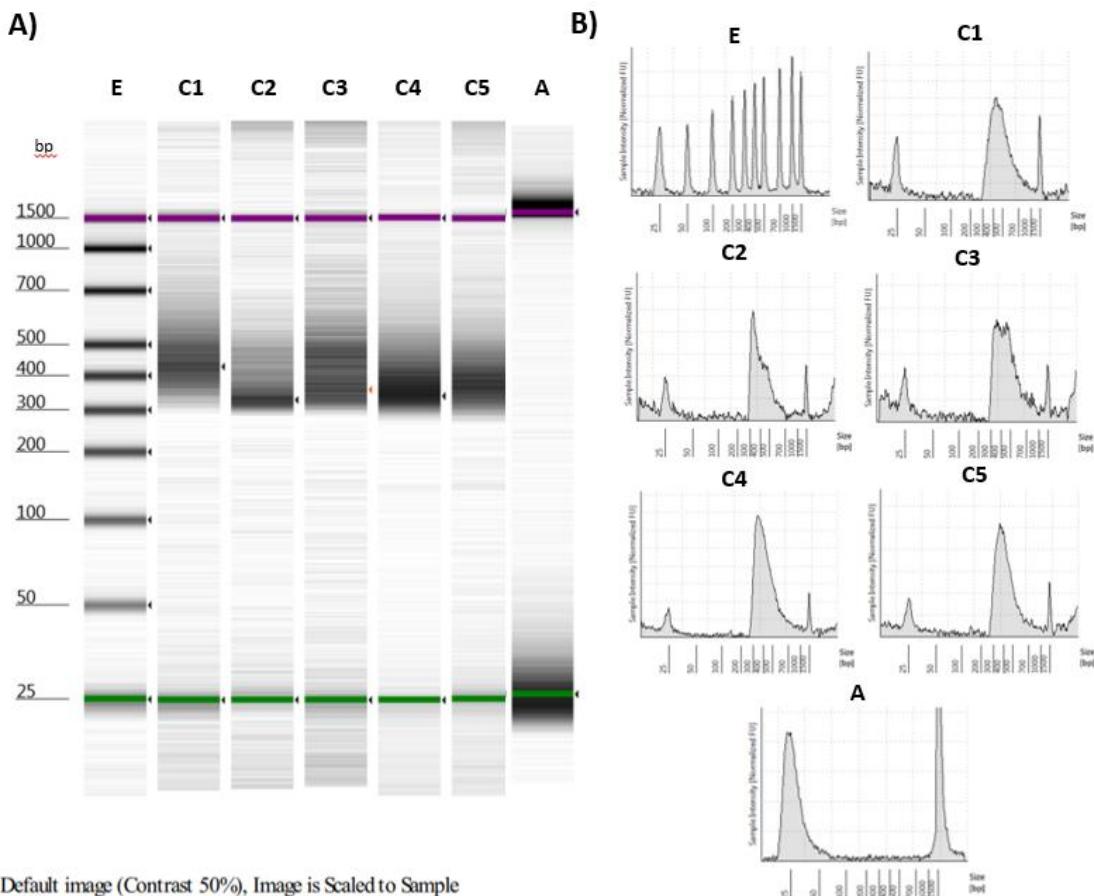


Figura 4. Electroforesis capilar de muestras de Cut&Run. **A.** Electroforesis capilar de las cinco muestras de Cut&Run. (C1 – C5) , escalera (E), y una muestra con agua (A). **B.** Distribución de la concentración de fragmentos de ADN (representada como intensidad de la muestra (normalizada)) distribuidos a lo largo del eje X en base a su tamaño (representado en pares de bases (*base pair*, bp)).

En primer lugar, se evidencia que el protocolo *Cut&Run* llevado a cabo ha funcionado, obteniendo así fragmentos de ADN libres de las muestras a estudiar. Además, se compararon las dos muestras con 100.000 células MEFs como material de partida. En una de ellas se había utilizado IgG (muestra C1) y en otra el anticuerpo RaH3K4me3 para la detección de la marca de interés del proyecto (muestra C2) (Figura 5; A). Como resultado se observa que la cantidad de fragmentos de ADN utilizando IgG tiene un pico de concentración en aquellos fragmentos que miden 430bp, y en general oscila entre 300 y 1.000bp. En la muestra que se usó RaH3K4me3 se observa un pico de concentración de fragmentos de ADN de un tamaño de 330pb, oscilando todos los fragmentos entre 290 y 700bp. Si se tiene en cuenta que un nucleosoma mide 147 pares de base y que durante la librería se unen una secuencia de adaptadores ilumina a los extremos de cada fragmento de ADN (75 pares de base cada uno), podemos estimar que el tamaño esperado de fragmentos cortados específicamente en ensayos *Cut&Run* ha de tener un

tamaño aproximado de 297bp. Esta medida coincide con el inicio del tamaño de los fragmentos de la curva de distribución de la muestra con R α H3K4me3, siendo muy aproximado al valor de su pico máximo de concentración. En esta misma curva se puede ver un pequeño segundo pico de concentración en los fragmentos que rondan los 400bp que coincidirían con la medida de dos nucleosomas, y un último pico a menor concentración alrededor de los 600bp que coinciden con tres nucleosomas. Adicionalmente presenta una concentración de ADN que apenas se sale de este patrón. Por ende, se concluye que al realizar *Cut&Run* usando R α H3K4me3 este se une específicamente en H3K4me3, y la p-MNAsa en la mayoría de los fragmentos corta selectivamente los nucleosomas. Al observar las diferencias en los patrones de distribución de tamaño de los fragmentos de ADN de IgG y R α H3K4me3 (Figura 5; A) se puede apreciar cómo no existen coincidencias aparentes entre ellas, lo que se podría traducir en una unión inespecífica de IgG a la cromatina mientras que R α H3K4me3 se unió específicamente a los nucleosomas.

En segundo lugar, se compararon los resultados obtenidos de las muestras correspondientes a la titulación del número de células usado como material de partida para saber si es posible bajar a 100 células iniciales. Al analizar los resultados de las muestras con 100.000, 10.000, 1.000 y 100 células (Figura 5; B), se observan patrones de distribución muy similares en todas ellas, además de picos de concentración muy parecidos que rondan entre 330 y 360pb de tamaño, medidas que siguen la misma explicación dada anteriormente para la muestra C2. Esto quiere decir que usando *Cut&Run* se obtuvieron resultados similares utilizando 100.000 células iniciales y 100 células iniciales, siendo específicos para H3K4me3. Por consiguiente, estos resultados abren la posibilidad de repetir el mismo protocolo para H3K4me3 usando 100 ovocitos iniciales y posteriormente poder aplicar técnicas de secuenciación, ya que se ha demostrado que los fragmentos obtenidos son específicos para la marca generando relación señal-ruido bajas. Considerando estos resultados, será necesario realizar también futuros ensayos analizando la posibilidad de adaptar la técnica *Cut&Run* a un número de células incluso menor (e.g. 15 ovocitos), permitiendo analizar ovocitos de una única hembra de ratón por muestra. Aunque este paso posibilitaría disminuir el número de animales usados y ofrecería información muy interesante (variabilidad entre animales), será necesario hacer balance de las ventajas y desventajas que ofrece en base a la calidad de los datos de secuenciación que se puedan obtener.

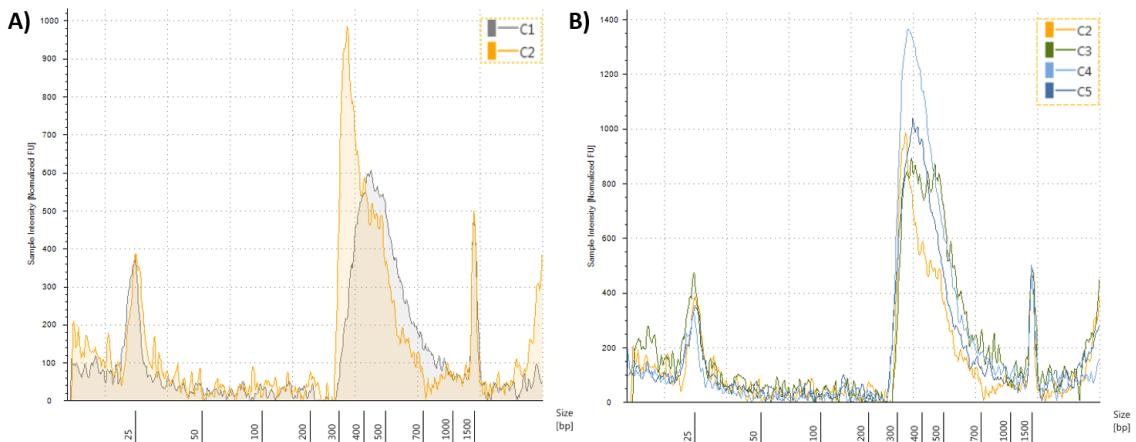


Figura 5. Comparativas de las gráficas de distribución de tamaño obtenidas mediante electroforesis capilar de muestras de *CUT&RUN*. A. Comparativa de la distribución de los fragmentos de ADN en base a su tamaño entre la muestra control negativo con IgG (C1) y la muestra con el anticuerpo R α H3K4me3 (C2). B. Comparativa de la distribución de los fragmentos de ADN en base a su tamaño entre muestras con anticuerpo R α H3K4me3 con distintos números de células MEFs de material de partida: 100.000 (C2), 10.000 (C3), 1.000 (C4), 100 (C5).

5.3 Cuantificación de H3K4me3 mediante inmunofluorescencia

Uno de los objetivos de este trabajo es el estudio de los posibles cambios que se pueden producir en los ovocitos GV a nivel de H3K4me3 durante el envejecimiento. Para ello, aplicamos la técnica de inmunofluorescencia, ya que permite tanto la cuantificación de los niveles globales de esta marca de histona de los ovocitos de forma individual, como identificar el estado de la cromatina de los ovocitos. Se realizó el estudio en ovocitos en estado de GV debido a que los cambios epigenéticos en esta fase podrían influir potencialmente en la estructura cromosómica y provocar errores meióticos posteriores (He et al., 2021). En este estado se pueden observar la cromatina en dos configuraciones diferentes: SN y NSN. Cuando el ovocito se encuentra en estado NSN la cromatina está poco condensada y no se dispone alrededor rodea el núcleo, asociándose a un estado de la cromatina transcripcionalmente activo. Mientras que en SN se observa una cromatina muy condensada y concentrada alrededor del núcleo que se relaciona con cromatina transcripcionalmente silenciada. En la etapa GV, la configuración SN prevalece sobre NSN (Kageyama et al., 2007).

Así, se analizaron los niveles de H3K4me3 en ovocitos GV de ratonas jóvenes y de ratonas viejas mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta. En primer lugar, se cuantificó la señal obtenida en los ovocitos usados como control negativo (sin anticuerpo primario) y obtuvimos niveles de señal en el canal de emisión del fluoróforo 488, que corresponde a la detección de

H3K4me3, muy por debajo de la media de intensidad de las muestras de ovocitos incubados con anticuerpo primario (datos no mostrados). Por tanto, la señal detectada en el espectro de emisión 488 es específica de la marca de histona H3K4me3.

Posteriormente, se analizó la intensidad de señal del canal del espectro de emisión del fluoróforo que corresponde al marcador de la cromatina DAPI. Al valorar los resultados de todos los ovocitos GV (NSN y SN agrupados) no se observó ninguna diferencia significativa entre la señal observada de DAPI en ovocitos jóvenes y en ovocitos viejos (Figura 6; A) ($p>0,05$ prueba estadística de *Mann-Whitney*). Al analizar la intensidad de H3K4me3 detectada, sí se observó una disminución significativa de la intensidad media de H3K4me3 en ovocitos viejos en comparación con ovocitos jóvenes (Figura 6; B) ($p<0,05$ prueba estadística de *Mann-Whitney*). Además, se realizó un análisis del ratio de H3K4me3/DAPI para saber si los posibles cambios hallados en H3K4me3 se debían a una modificación de la cromatina asociada a la edad (figura 6; C). Considerando que las diferencias significativas de los menores niveles de intensidad de H3K4me3 se mantienen significativos en este análisis, se puede decir que se produce un descenso de H3K4me3 en ovocitos viejos respecto a ovocitos jóvenes independientemente de los cambios que pueda haber en la cromatina ($p<0,05$ prueba estadística de *Mann-Whitney*). Con estos resultados se concluyó que H3K4me3 disminuye en el núcleo de los ovocitos a lo largo del envejecimiento. Sorprendentemente, este resultado no concuerda con dos estudios independientes , Wasserzug-Pash et al. (2022) y Shao et al. (2015), en los que no obtienen diferencias significativas en los niveles de H3K4me3 entre ovocitos GV ratones hembra jóvenes 6 – 8 semanas de edad y viejas 9 - 11 meses de edad.

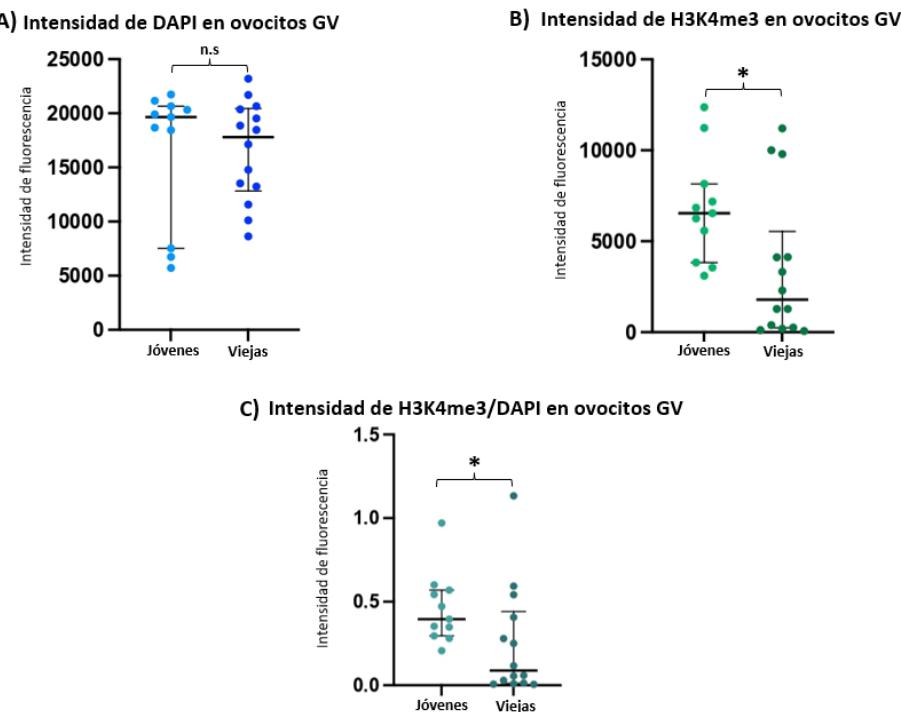


Figura 6. Inmunofluorescencia de H3K4me3 en ovocitos GV durante el envejecimiento.

A-B. Representación de la cuantificación de la intensidad media de la señal de DAPI (A.), y H3K4me3 (B.). **C.** Representación del ratio de las intensidades de H3K4me3/DAPI. Cada punto representa un ovocito. Número de ovocitos analizados: ovocitos jóvenes (N=11), ovocitos viejos (N=14). (*: p<0,05, test estadístico Mann-Whitney) (n.s: no hay diferencias significativas).

Con el objetivo de analizar de manera más detallada estas discrepancias y si las diferencias obtenidas en los niveles de H3K4me3 en ovocitos GV eran dependientes del estado de configuración de la cromatina de éstos, se analizaron las muestras con configuración SN y NSN por separado (Figura 7; A y 7; C). Al analizar los ovocitos con configuración SN se observó el mismo patrón que al analizar todos los ovocitos en conjunto: 1) no se obtuvieron diferencias significativas en la intensidad de señal de DAPI entre ovocitos jóvenes y ovocitos viejos (Figura 7; B) ($p>0,05$ prueba estadística de T de Student), y 2) se halló una disminución estadísticamente significativa de la intensidad de señal de H3K4m3 en ovocitos viejos frente a la intensidad media de los ovocitos jóvenes (Figura 7; B) ($p<0,05$ prueba estadística de Mann-Whitney). Al analizar los ovocitos con configuración NSN no se observó una diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia de DAPI (Figura 7; D) ($p>0,05$ prueba estadística de T de Student). Sorprendentemente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la intensidad media de la señal de H3K4me3 entre ovocitos jóvenes y viejos con configuración NSN (Figura 7; D) ($p>0,05$ prueba estadística de Mann-Whitney). Aunque esto podría sugerir que el envejecimiento no afecta a los niveles de H3K4me3 en ovocitos NSN, en contraste con los

ovocitos SN, y que existe una posible relación entre H3K4me3 y la conformación de la cromatina, la limitación en el número de ovocitos analizados es insuficiente para poder establecer una conclusión definitiva.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan parcialmente con los publicados por Wu et al. (2022). En esta publicación se muestran diferencias significativas en niveles de H3K4me3 entre ovocitos GV de ratones jóvenes y viejas con conformación SN, de forma similar a lo obtenido en este trabajo, pero también en ovocitos NSN. Sin embargo, las imágenes publicadas de los ovocitos de su estudio no cumplen con los patrones morfológicos definidos para NSN, el número de muestra utilizado también es limitado ($N=8$) y se desconoce el marcaje usado para la tinción de la cromatina. Por otro lado, Manosalva y González (2010) en su estudio analizan la alteración de la cromatina durante el envejecimiento realizando una inmunofluorescencia con DAPI en ovocitos GV y separándolos en conformaciones SN y NSN. Como resultado obtuvieron que la conformación de la cromatina NSN estaba presente en un porcentaje menor en ovocitos GV viejos en comparación con los jóvenes, pero se desconoce hasta la fecha si esta diferencia significativa puede explicar la disminución de H3K4me3.

En definitiva, tras el análisis de los resultados obtenidos y en relación con los datos publicados de otros autores, es esencial analizar de forma detallada los niveles de H3K4me3 con un número mayor de ovocitos y en ambas configuraciones morfológicas de la cromatina para obtener resultados representativos y hallar respuestas definitivas al comportamiento de H3K4me3 en ovocitos GV durante el envejecimiento.

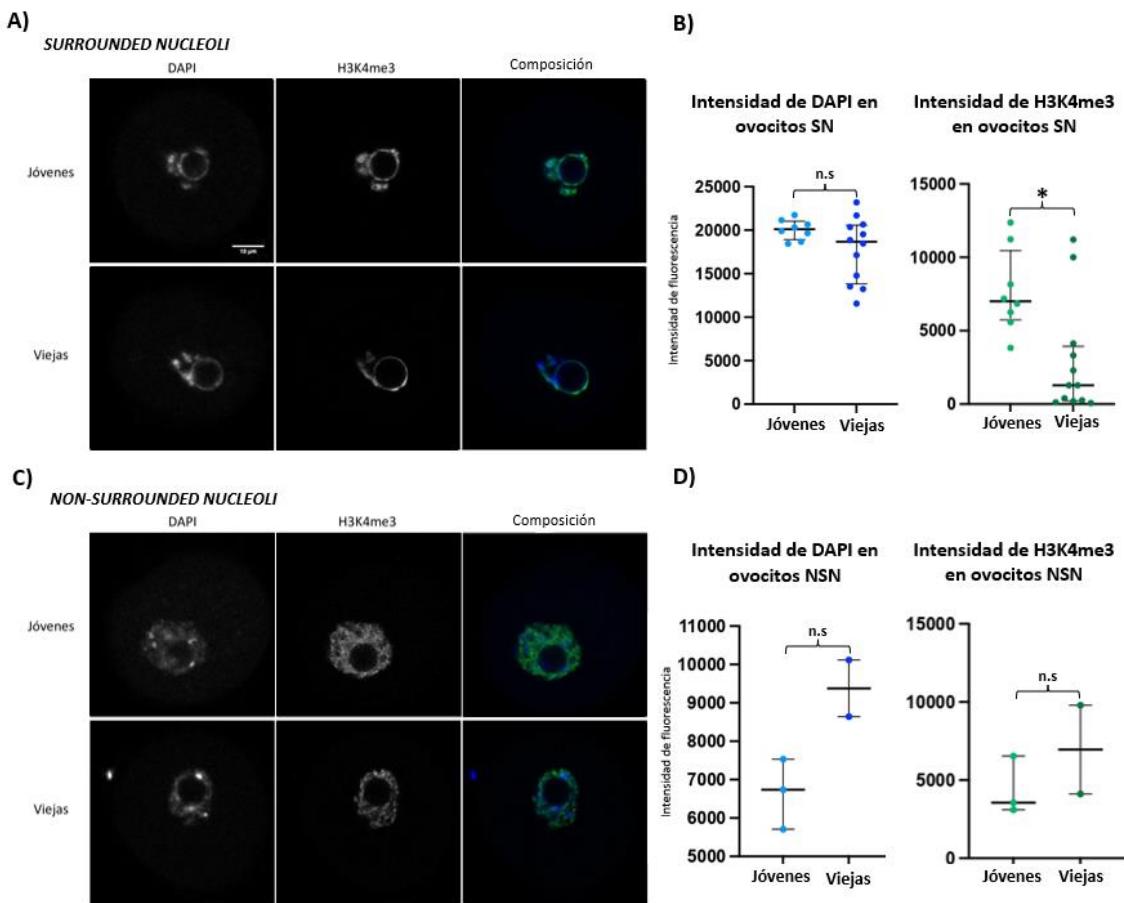


Figura 7. Inmunofluorescencia de H3K4me3 en ovocitos GV SN y NSN durante el envejecimiento. A-D. Inmunofluorescencia de DAPI y H3K4me3 en SN (A.) y NSN (C.). Representación de la cuantificación de la intensidad media de la señal de DAPI, y H3K4me3 en ovocitos SN (B.) y NSN (D.). Cada punto representa un ovocito. Número de ovocitos analizados en SN: ovocitos jóvenes (N=8), ovocitos viejos (N=12). Número de ovocitos analizados en NSN: ovocitos jóvenes (N=3), ovocitos viejos (N=2). (*: p<0,05 test estadístico Mann-Whitney) (n.s: no hay diferencias significativas).

6. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

Conclusiones:

- I. Existen pocos estudios que aporten información acerca de la metilación y acetilación de histonas en el envejecimiento de ovocitos en estadio de vesícula germinal en mamíferos. Se han reportado variaciones en la metilación de 9 marcas de histonas y en la acetilación de 5 marcas de histonas asociadas al envejecimiento.
- II. Hay muy pocas publicaciones que concluyan el papel de H3K4m3 en el envejecimiento, existiendo además resultados discordantes en diferentes investigaciones.

- III. *Cut&Run* es una técnica eficaz para obtener fragmentos de ADN enriquecidos en H3K4me3 en células somáticas. Se han obtenido perfiles satisfactorios de *Cut&Run* para H3K4me3 con un número inicial de tan sólo 100 células.
- IV. Los niveles de H3K4me3 disminuyen de forma significativa en ovocitos en estadio en estadio de vesícula germinal en el envejecimiento cuando se analizan de forma global. Esta disminución sigue siendo significativa con independencia de posibles variaciones en la cantidad de cromatina de los ovocitos.
- V. Los niveles de H3K4me3 disminuyen de forma significativa en ovocitos en estadio de vesícula germinal con configuración de la cromatina SN en el envejecimiento. No se observa una reducción de los niveles de H3K4me3 en ovocitos NSN, aunque su limitado tamaño muestral no permite sacar conclusiones definitivas.
- VI. La adaptación del protocolo *Cut&Run* a un número reducido de células y la observación de la disminución de H3K4me3 en ovocitos en el envejecimiento mediante ensayos de inmunofluorescencia, da paso al estudio de las alteraciones de H3K4me3 en ovocitos murinos y humanos en el envejecimiento mediante la generación de mapas del epigenoma.

Conclusions:

- I. *There is a very limited number of studies providing information about histone methylation and acetylation in the aging of germinal vesicle oocytes in mammals. Variations in the methylation of 9 histone marks and the acetylation of 5 histone marks associated with aging have been reported.*
- II. *There are very few publications conclusively addressing the role of H3K4me3 in aging, with discordant results across different studies.*
- III. *Cut&Run is an effective technique for obtaining H3K4me3-enriched DNA fragments in somatic cells. Satisfactory Cut&Run profiles for H3K4me3 have been obtained with as few as 100 cells of input.*
- IV. *H3K4me3 levels significantly decrease in aging of germinal vesicle oocytes, when analyzed globally. This decrease remains significant regardless of potential variations in the oocyte chromatin quantity.*
- V. *H3K4me3 levels significantly decrease in aging of germinal vesicle oocytes with surrounded nucleoli chromatin configuration. No reduction in H3K4me3 levels is observed in non- surrounded nucleoli oocytes, although limited sample size prevents conclusive findings.*

VI. *Modifying the Cut&Run protocol for a reduced cell number and observing the decrease in H3K4me3 in aging oocytes through immunofluorescence assays enables the study of H3K4me3 alterations in murine and human oocytes during aging by generating epigenome maps.*

7. VALORACIÓN PERSONAL

Tras todo lo investigado y aprendido acerca de las modificaciones de histona, como H3K4me3, en ovocitos de mamíferos y las técnicas que se emplean para su estudio, considero que se requiere continuar con esta línea de investigación para poder llegar a hallar respuestas a la pregunta de cómo afecta el envejecimiento a estas marcas epigenéticas. En mi opinión este campo puede ofrecer técnicas terapéuticas y de diagnóstico muy prometedoras a problemas relacionados con la fertilidad en mujeres o alteraciones reproductivas.

Desde un enfoque más académico, profundizar en un tema que hasta hace menos de un año desconocía, aprender nuevas técnicas de laboratorio, mejorar mis habilidades de búsqueda bibliográfica y aprender a usar programas de análisis de datos, me ha servido para enriquecerme como profesional, y sobretodo me ha ayudado para saber hacia dónde quiero redirigir mi futuro como veterinaria a partir de ahora.

Finalmente quería agradecer a mis tutoras en este trabajo, Raquel Pérez y María Climent, por enseñarme tantas cosas acerca de este tema y resolver mis dudas acerca del mundo de la investigación. Y también agradecer a mi familia y amigos por el apoyo y cariño ilimitado que he recibido estos años vividos en la facultad.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Akdogan-Ozdilek, B., Duval, K.L., Meng, F.W., Murphy, P.J. y Goll, M.G. (2022) "Identification of chromatin states during zebrafish gastrulation using CUT&RUN and CUT&Tag". *Developmental Dynamics*, 251(4), pp. 729-742. DOI:10.1002/dvdy.430.
- Akiyama, T., Nagata, M., Aoki, F. y Meyer, B.J. (2006) "Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(19), pp. 7339-7344. [Consultado 24-11-2023] Disponible en: www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0510946103.
- Christou-Kent, M., Dhellemmes, M., Lambert, E., Ray, P.F. y Arnoult, C. (2020) "Diversity of RNA-Binding Proteins Modulating Post-Transcriptional Regulation of Protein Expression in the Maturing Mammalian Oocyte". *Cells*. NLM (Medline). DOI:10.3390/cells9030662.
- Deans, C. y Maggert, K.A. (2015) "What do you mean, «Epigenetic»?". *Genetics*, 199(4), pp. 887-896. DOI:10.1534/genetics.114.173492.
- Gosden, R. y Lee, B. (2010) "Portrait of an oocyte: Our obscure origin". *Journal of Clinical Investigation*, pp. 973-983. DOI:10.1172/JCI41294.
- Greer, E.L., Maures, T.J., Hauswirth, A.G., Green, E.M., Leeman, D.S., Maro, G.S., Han, S., Banko, M.R., Gozani, O. y Brunet, A. (2010) "Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*". *Nature*, 466(7304), pp. 383-387. DOI:10.1038/nature09195.
- Hamilton, P.J. y Nestler, E.J. (2019) "Epigenetics and addiction". *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Ltd, pp. 128-136. DOI:10.1016/j.conb.2019.05.005.
- Hanna, C.W., Demond, H. y Kelsey, G. (2018) "Epigenetic regulation in development: Is the mouse a good model for the human?". *Human Reproduction Update*, 24(5), pp. 556-576. DOI:10.1093/humupd/dmy021.
- He, M., Zhang, T., Yang, Y. y Wang, C. (2021) "Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation". *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A. DOI:10.3389/fcell.2021.654028.
- Hughes, A.L., Kelley, J.R. y Klose, R.J. (2020) "Understanding the interplay between CpG island-associated gene promoters and H3K4 methylation". *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier B.V. DOI:10.1016/j.bbagr.2020.194567.

Jirtle, R. L., y Skinner, M. K. (2007). "Environmental epigenomics and disease susceptibility." *Nature Reviews Genetics*, 8(4), pp. 253-262. DOI:10.1038/nrg2045.

Li, Y. (2021) "Modern epigenetics methods in biological research". *Methods*. Academic Press Inc., pp. 104-113. DOI:10.1016/j.ymeth.2020.06.022.

Lin, T., Sun, L., Lee, J.E., Lee, J. Bin, Kim, S.Y. y Jin, D. II (2020) "Changes of histone H3 lysine 23 acetylation and methylation in porcine somatic cells, oocytes and preimplantation embryos". *Theriogenology*, 148, pp. 162-173. DOI:10.1016/j.theriogenology.2020.03.006.

Lucea, J., & Martínez, M. (2012). "Ethical reflections on cell reprogramming." *Cuadernos de Bioetica: Revista Oficial de la Asociacion Espanola de Bioetica y Etica Medica*, 23(78), 287-299. Consultado en: <https://europepmc.org/article/med/23130744> [Consultado 19-11-2023].

Manosalva, I. y González, A. (2009) "Aging alters histone H4 acetylation and CDC2A in mouse germinal vesicle stage oocytes". *Biology of Reproduction*, 81(6), pp. 1164-1171. DOI:10.1095/biolreprod.109.078386.

Manosalva, I. y González, A. (2010) "Aging changes the chromatin configuration and histone methylation of mouse oocytes at germinal vesicle stage". *Theriogenology*, 74(9), pp. 1539-1547. DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.06.024.

Marshall, K.L., Wang, J., Ji, T. y Rivera, R.M. (2018) "The effects of biological aging on global DNA methylation, histone modification, and epigenetic modifiers in the mouse germinal vesicle stage oocyte". *Animal Reproduction*, 15(4), pp. 1253-1267. DOI:10.21451/1984-3143-AR2018-0087.

McCauley, B.S. y Dang, W. (2014) "Histone methylation and aging: Lessons learned from model systems". *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier, pp. 1454-1462. DOI:10.1016/j.bbagr.2014.05.008.

Michalak, E.M., Burr, M.L., Bannister, A.J. y Dawson, M.A. (2019) "The roles of DNA, RNA and histone methylation in ageing and cancer". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, pp. 573-589. DOI:10.1038/s41580-019-0143-1.

Moghadam, A.R.E., Moghadam, M.T., Hemadi, M. y Saki, G. (2022) "Oocyte quality and aging". *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*. SBRA - Associação Brasileira de Reprodução Assistida (Brazilian Society of Assisted Reproduction), pp. 105-122. DOI:10.5935/1518-0557.20210026.

Ragazzini, R., Pérez-Palacios, R., Baymaz, I.H., Diop, S., Ancelin, K., Zielinski, D., Michaud, A., Givelet, M., Borsos, M., Aflaki, S., Legoix, P., Jansen, P.W.T.C., Servant, N., Torres-Padilla, M.E., Bourc'his, D., Fouchet, P., Vermeulen, M. y Margueron, R. (2019) "EZHIP constrains Polycomb Repressive Complex 2 activity in germ cells". *Nature Communications*, 10(1). DOI:10.1038/s41467-019-11800-x.

Sha, Q.Q., Zhang, J. y Fan, H.Y. (2020) "Function and Regulation of Histone H3 Lysine-4 Methylation During Oocyte Meiosis and Maternal-to-Zygotic Transition". *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A. 8, pp. 597498DOI:10.3389/fcell.2020.597498.

Shao, G.B., Chen, J.C., Zhang, L.P., Huang, P., Lu, H.Y., Jin, J., Gong, A.H. y Sang, J.R. (2014) "Dynamic patterns of histone H3 lysine 4 methyltransferases and demethylases during mouse preimplantation development". *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 50(7), pp. 603-613. DOI:10.1007/s11626-014-9741-6.

Shao, G.B., Wang, J., Zhang, L.P., Wu, C.Y., Jin, J., Sang, J.R., Lu, H.Y., Gong, A.H., Du, F.Y. y Peng, W.X. (2015) "Aging alters histone H3 lysine 4 methylation in mouse germinal vesicle stage oocytes". *Reproduction, Fertility and Development*, 27(2), pp. 419-426. DOI:10.1071/RD13293.

Skene, P.J. y Henikoff, S. (s. f.) "An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites". DOI:10.7554/eLife.21856.001.

Stewart, K.R., Veselovska, L., Kim, J., Huang, J., Saadeh, H., Tomizawa, S.I., Smallwood, S.A., Chen, T. y Kelsey, G. (2015) "Dynamic changes in histone modifications precede de novo DNA methylation in oocytes". *Genes and Development*, 29(23), pp. 2449-2462. DOI:10.1101/gad.271353.115.

Wang, L., Xu, Z., Khawar, M.B., Liu, C. y Li, W. (2017) "The histone codes for meiosis". *Reproduction*. BioScientifica Ltd., pp. R65-R79. DOI:10.1530/REP-17-0153.

Wang, Y., Yuan, Q. y Xie, L. (2018) "Histone Modifications in Aging: The Underlying Mechanisms and Implications". *Current Stem Cell Research & Therapy*, 13(2). DOI:10.2174/1574888x12666170817141921.

Wasserzug-Pash, P., Rothman, R., Reich, E., Zecharyahu, L., Schonberger, O., Weiss, Y., Srebnik, N., Cohen-Hadad, Y., Weintraub, A., Ben-Ami, I., Holzer, H. y Klutstein, M. (2022) "Loss of heterochromatin and retrotransposon silencing as determinants in oocyte aging". *Aging Cell*, 21(3). DOI:10.1111/acel.13568.

Wu, Y.W., Li, S., Zheng, W., Li, Y.C., Chen, L., Zhou, Y., Deng, Z.Q., Lin, G., Fan, H.Y. y Sha, Q.Q. (2022) "The effects of biological aging on global DNA methylation, histone modification,". *Nature Communications*, 13(1). DOI:10.1038/s41467-022-30928-x.

Xiang, Q., Zhao, Y., Lin, J., Jiang, S. y Li, W. (2022) "Epigenetic modifications in spinal ligament aging". *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd. 77, p. 101598 DOI:10.1016/j.arr.2022.101598.

Yu, C., Fan, X., Sha, Q.Q., Wang, H.H., Li, B.T., Dai, X.X., Shen, L., Liu, J., Wang, L., Liu, K., Tang, F. y Fan, H.Y. (2017) "CFP1 Regulates Histone H3K4 Trimethylation and Developmental Potential in Mouse Oocytes". *Cell Reports*, 20(5), pp. 1161-1172. DOI:10.1016/j.celrep.2017.07.011.

Zhang, B., Zheng, H., Huang, B., Li, W., Xiang, Y., Peng, X., Ming, J., Wu, X., Zhang, Y., Xu, Q., Liu, W., Kou, X., Zhao, Y., He, W., Li, C., Chen, B., Li, Y., Wang, Q., Ma, J. et al. (2016) "Allelic reprogramming of the histone modification H3K4me3 in early mammalian development". *Nature*, 537(7621), pp. 553-557. DOI:10.1038/nature19361.

9. ANEXOS

Resultados del análisis estadístico de inmunofluorescencia

SN

	DATOS ESTADÍSTICOS	JÓVENES	VIEJAS
H3K4me3	Mediana ± DE	7.010,933 ± 2.854,821	1.284,826 ± 3.850,907
	Mínimo	3.827,300	65,150
	Máximo	12.368,995	11.200,376
DAPI	Media ± DE	20.072,965 ± 1.140,915	17.753,907 ± 3.703,082
	Mínimo	18.454,03	11.575,78
	Máximo	21.740,48	23.197,15

NSN

	DATOS ESTADÍSTICOS	JÓVENES	VIEJAS
H3K4me3	Mediana ± DE	3.558,093 ± 1.868,329	6.955,521 ± 4.012,870
	Mínimo	3.102,102	4.117,994
	Máximo	6.541,953	9.793,049
DAPI	Media ± DE	6.659,205 ± 913,361	9.378,202 ± 1.043,456
	Mínimo	5.709,89	8.640,37
	Máximo	7.531,77	10.116,04

NSN+SN

	DATOS ESTADÍSTICOS	JÓVENES	VIEJAS
H3K4me3	Mediana ± DE	6.541,953 ± 2.958,057	1.788,756 ± 3.997,263
	Mínimo	3102,102	65,150
	Máximo	12.368,995	11.200,376
DAPI	Mediana ± DE	19.661,915 ± 6.351,004	17.804,453 ± 5.312,095
	Mínimo	5.709,89	4.117,99
	Máximo	21.740,48	23.197,15
Ratio H3K4me3/DAPI	Mediana ± DE	0,395 ± 0,212	0,088
	Mínimo	0,21	0,01
	Máximo	0,97	1,13