

PROTAMINES I INFERTILITAT EN L'HOME

RAFAEL OLIVA

Laboratori de Genètica Humana, Unitat de Genètica, Departament de Ciències Fisiològiques I, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona i Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

Adreça per a la correspondència: Rafael Oliva. Laboratori de Genètica Humana, Unitat de Genètica, Departament de Ciències Fisiològiques I, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona. Casanova, 143. 08036 Barcelona. Adreça electrònica: roliva@ub.edu.

RESUM

Les protamines són les proteïnes majoritàries del nucli de l'espermatozoide en moltes espècies i actuen empaquetant el genoma patern. En l'home s'han detectat alteracions en els nivells de les protamines P1 i P2 associats a infertilitat. Ratolins transgènics defectius en l'expressió de les protamines també presenten alteracions en l'estructura del nucli de l'espermatozoide i un grau variable d'infertilitat. Existeix també evidència que defectes en els nivells de protamines poden associar-se a un increment de lesió en el genoma de l'espermatozoide. En el present treball es revisen els principals articles disponibles sobre la relació entre protamines i infertilitat en l'home.

Paraules clau: Protamina, infertilitat, espermatozoide, cromatina, mutació, ICSI, genoma.

SUMMARY

Protamines are the major proteins present in the nuclei of the spermatozoa and they act packing the paternal genome. Changes in the expression of P1 and P2 protamines have been found to be associated with infertility in man. Transgenic mice defective in the expression of protamines also present several structural defects in the sperm nucleus and have variable degrees of infertility. There is also evidence that altered levels of protamines can be associated with an increase of injury in the genome of the spermatozoa. In the present work the main available papers on the relationship between protamines and infertility in man are revised.

Keywords: Protamine, infertility, spermatozoa, chromatin, mutation, ICSI, genome.

INTRODUCCIÓ

Les protamines són les proteïnes més abundants del nucli de l'espermatozoide i actuen

empaquetant el genoma patern (Kossel, 1928; Bloch, 1969; Mezquita i Teng, 1977; Subirana, 1982; Mezquita, 1985; Oliva i Dixon, 1991; Lewis *et al.*, 2003; Aoki i Carell, 2003). Es

tracta de proteïnes amb un alt contingut d'aminoàcids amb càrrega positiva i, en especial, d'arginina (un 48 % en les protamines humanes; vegeu la taula 1).

En vertebrats es coneixen dos tipus de protamines, les P1, que estan presents en totes les espècies de vertebrats estudiades, i la família de la protamina P2 (vegeu la taula 1). La protamina P2 està formada pels components P2, P3 i P4, i es troba només en algunes espècies de mamífer, entre les quals es troben l'home i el ratolí. Els components de la família P2 difereixen només per l'extensió N-terminal d'un a quatre residus, encara que el component P2 és el majoritari de la família (vegeu la taula 1 i la figura 1; Gusse *et al.*, 1986; Oliva i Dixon, 1991; Bianchi *et al.*, 1992; Arkhis *et al.*, 1991). La protamina P1 és sintetitzada com una proteïna madura, mentre que els components de la família de la protamina P2 són generats per proteòlisi a partir d'un precursor codificat per un únic gen (Queralt *et al.*, 1995). El contingut de protamina P1 en el nucli de l'espermatozoide humà és semblant al contingut de protamina P2 (relació P1/P2 aproximada d'1) (Balhorn *et al.*, 1988; Yebra *et al.*, 1993).

Des del punt de vista evolutiu es tracta de proteïnes que han augmentat el nombre de residus amb càrrega positiva, cosa que permet formar un complex condensat amb el DNA del genoma patern que té una forta càrrega negativa. A més, les protamines de diverses espècies incorporen cisteïnes en la seva seqüència, fet que permet la creació de ponts disulfur entre les molècules de protamines adjacents que estableixen fortament el complex nucleoprotamina. Existeix ja una clara evidència que, almenys les protamines de bivalbes, poden haver evolucionat a partir de la histona H1 (Lewis *et al.*, 2004). Un altre aspecte que caracteritza les protamines és que es troben entre les proteïnes amb un dels nivells més elevats de variació evolutiva (Oliva i Dixon, 1991; Queralt *et al.*, 1995; Oliva, 1995; Lewis *et al.*, 2003). S'ha proposat que la causa d'aquesta ràpida evolució es trobaria en una

selecció darwiniana positiva (Wyckoff *et al.*, 2000; Clark i Civetta, 2000). Aquesta proposta estaria recolzada per l'observació, en comparar la seqüència de protamines de diferents espècies, que la relació entre substitucions no sinònimes (els canvis de nucleòtid que canvien l'aminoàcid) per residu i les substitucions sinònimes per residu és superior a 1 (Wyckoff *et al.*, 2000).

Existeixen diverses funcions proposades per a les protamines. La més òbvia seria la de condensar el genoma patern en un nucli com més compacte i hidrodinàmic millor. Els espermatozoides amb el nucli més condensat i hidrodinàmic tindrien avantatge sobre els altres i aconseguirien fecundar primer l'oòcit i, per tant, transmetrien el canvi genètic avantatjós a través d'una marcada selecció darwiniana a les futures generacions. Un altra funció proposada per a les protamines seria la de protecció del missatge genètic patern fent-lo inaccessible a possibles nucleases o mutàgens del medi intern o extern. Aquesta hipòtesi podria tenir sentit si es considera que la presència d'un genoma lesionat en l'espermatozoide és compatible amb la fecundació de l'oòcit però no amb el seu desenvolupament. Però les dades actuals més aviat indiquen que la presència de protamines pot actuar potenciant l'efecte de certs tòxics o metalls pesants a l'espermatozoide. Un altra possible funció per a les protamines seria que actuessin competint i desplaçant factors de transcripció i d'altres proteïnes per tal de deixar el missatge genètic patern desproveït d'informació epigenètica, de manera que en permetria la reprogramació per l'oòcit.

ALTERACIONS DE LES PROTAMINES EN L'ESPERMATOZOIDE EN PACIENTS INFÈRTILS

La primera evidència d'alteracions en el contingut de protamines es descriu en un treball en el qual els autors no detecten protami-

TAULA 1. Seqüència de les protamines humanes P1 i P2

| Protamina | Seqüència d'aminoàcids |
|-------------|--|
| P1 | ARYRCCRSQSRSRYYRQRQSRRRRRRRSCQTRRRAMCCRPYRPRCRRH |
| Família P2: | |
| P2 | RTHGQSHYRRRHCSRRLHLRIHRRQHRSRRRKRSSCRHRRRRHRRGCRTRKRTCRRH |
| P3 | GQSHYRRRHCSRRLHLRIHRRQHRSRRRKRSSCRHRRRRHRRGCRTRKRTCRRH |
| P4 | ERTHGQSHYRRRHCSRRLHLRIHRRQHRSRRRKRSSCRHRRRRHRRGCRTRKRTCRRH |

nes en els espermatozoides de diversos pacients infèrtils sinó només histones (Silvestroni *et al.*, 1976). Subsegüentment es descriuen per a un grup independent diversos pacients amb un patró proteic anòmal caracteritzat per la presència de proteïnes addicionals en l'espermatozoide humà, tot i que en aquest treball no es fa referència a alteracions en els nivells de protamines (Chevalier *et al.*, 1987). Però el primer treball que analitza les protamines en una sèrie àmplia de controls fèrtils ($n = 17$) i compara les dades amb les de pacients ($n = 7$), detecta un quocient P1/P2 augmentat en sis dels set pacients estudiats (Balhorn *et al.*, 1988). Seguidament es descriu que el percentatge de protamines d'homes fèrtils no es diferencia de manera significativa en comparació amb els pacients infèrtils amb paràmetres seminals normals, però sí que varia en els pacients amb paràmetres seminals anòmals (Bach *et al.*, 1990). Un altre grup independent descriu que els pacients amb anomalies morfològiques a l'espermatozoide caracteritzades per la presència d'un cap rodó contenen menys protamines i més histones que els espermatozoides normals (Blanchard *et al.*, 1990).

L'observació d'una disminució de protamina P2 i d'una relació P1/P2 augmentada es confirma uns anys més tard (Belokopytova *et al.*, 1993). Però no és fins a la descripció de la primera sèrie àmplia de pacients ($n = 116$) que es determina que un 3,4 % dels pacients ($n = 4$) presenten una marcada reducció de protamina P2 (Yebra *et al.*, 1993; Yebra i Oliva, 1993), mentre que la resta de pacients presenten un quocient P1/P2 normal (22,4 %) o bé lleugerament alterat (74,1 %).

Totes aquestes observacions plantejaren la qüestió de l'origen de la reducció del nivells de protamina P2 relatius als nivells de protamina P1 en alguns dels pacients. La detecció d'un increment de precursors de protamina P2 en els pacients amb un increment del quocient P1/P2 va acotar el possible origen en un defecte o aturada del processament del precursor de la protamina P2 (Yebra *et al.*, 1998). Aquestes dades són coherents amb els resultats de l'anàlisi dels continguts de fòsfor i sofre d'espermatozoides individuals analitzats per la tècnica de PIXE (Particle Induced X-ray Emission; Bench *et al.*, 1998). En aquest mateix estudi es detecta addicionalment que les relacions de protamines P1/P2 varien en mostres diferents dels mateixos pacients obtingudes separades en el temps (Bench *et al.*, 1998).

Tots aquests treballs inicials es varen fer analitzant les mostres de semen sense fraccionar. És un fet conegut que en una ejaculació humana normal es troben tant poblacions d'espermatozoides morfològicament normals com espermatozoides aberrants. Per tant, es va plantejar si les alteracions detectades en la relació P1/P2 afectaven la totalitat de les cèl·lules de la mostra dels pacients o bé eren el resultat d'una barreja de poblacions. Es coneixia ja que la centrifugació d'espermatozoides en gradient de Percoll en permetia el fraccionament segons la seva morfologia i mobilitat, i que les fraccions més denses estaven enriquides en menys proteïnes intermèdies i més protamina P2 madura (Colleu *et al.*, 1996). Però la separació mitjançant gradient de Percoll de les cèl·lules de les ejaculacions individuals de pacients infèrtils i de controls

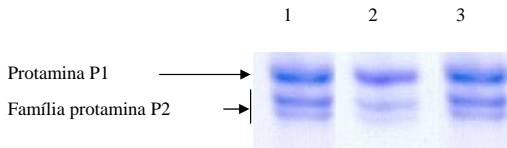


FIGURA 1. Electroforesi en gel de poliacrilamida de les protamines extretes d'espermatozoides de diversos pacients infèrtils (1-3) i tenyides amb Coomassie Blue.

i l'anàlisi subsegüent de la relació P1/P2 en cadascuna de les fraccions va demostrar que no existien diferències significatives en la relació P1/P2 entre les diverses fraccions que diferien en la morfologia i mobilitat (Mengual *et al.*, 2003). En canvi, sí que es varen detectar diferències significatives en la relació P1/P2 quan es comparaven el grup de pacients astenozoospermics amb el grup de pacients normozoospermics o amb els controls (Mengual *et al.*, 2003).

Si bé en els treballs previs es va descriure un increment de la relació P1/P2, en un article recent en què s'analitzen 272 pacients infèrtils i 87 donants es detecta un nou grup de pacients caracteritzat per una disminució de la relació P1/P2 (Aoki *et al.*, 2005).

A part dels estudis en pacients infèrtils, l'expressió de protamines en l'espermatozoide també s'ha determinat en relació a l'estrès tèrmic en testicles normals (Love i Kenney, 1999; Evenson *et al.*, 2000). L'estrès tèrmic en el testicle de cavall s'associa a una disminució de la formació de ponts disulfur en les protamines (Love i Kenney, 1999). Aquest aspecte també s'ha estudiat en l'espècie humana mesurant els nivells d'expressió de les protamines en un pacient que acabava de passar un episodi d'hipertèrmia induïda per la grip (Evenson *et al.*, 2000). En concret, es va trobar que apareixia un precursor de la protamina P2 entre els dies 33 i 39 posthipertèrmia. Aquest autors també varen detectar que la relació P1/P2 es mantenia en el rang normal, mentre la relació entre histones i protamines pujava lleugerament els dies 33 i 39 posthipertèrmia. L'expressió del gen corresponent a la protamina P2 també

s'ha trobat alterada concomitantment a l'estrès tèrmic en el testicle de ratolí (Iuchi *et al.*, 2003).

ALTERACIONS DE LES PROTAMINES I CAPACITAT DE FERTILITZACIÓ *IN VITRO* DELS ESPERMATOZOIDES

La primera evidència que una alteració de les protamines podria estar en relació amb la capacitat de fecundació *in vitro* dels espermatozoides es va basar en la comparació de la relació P1/P2 en dos grups de pacients infèrtils classificats d'acord al fet si havien assolit un índex de fertilització superior o inferior al 50% (Khara *et al.*, 1997). En concret, aquests autors trobaren una relació P1/P2 entre 0,55 i 1,29 en el grup amb índex de fertilització igual o superior al 50%, mentre que tres dels pacients infèrtils que havien assolit un índex de fertilització inferior al 50% presentaven una relació fora d'aquest rang (Khara *et al.*, 1997). No obstant això, aquests mateixos autors no recolzaren la idea que la relació alterada P1/P2 fos la causa primària de la reducció en l'índex de fertilització.

Uns anys més tard es descriu, en una sèrie més àmplia de pacients, que existeix una reducció significativa en l'assaig de penetració en dotze dels tretze pacients sense protamina P2 en comparació amb els pacients amb protamina P2 (Carell i Liu, 2001). Però cal tenir en compte que en aquest treball es detecta una proporció molt incrementada de pacients sotmesos a fertilització *in vitro* sense P2 detectable (17%, 13 de 75), fet que contrasta amb altres articles publicats per altres grups (Yebara *et al.*, 1993; Mengual *et al.*, 2003) o en treballs més recents publicats pel mateix grup (Aoki *et al.*, 2005). En aquest treball també descriuen que la detecció de bandes de precursors de protamines s'associa a una reducció en la capacitat de penetració (Carell i Liu, 2001). Aquest fet lligaria amb les observacions prèvies que els pacients amb un increment de

la relació P1/P2 també tenen nivells augmentats de precursors de P2 (Yebra *et al.*, 1998). No obstant això, aquests autors no trobaren cap diferència significativa en els resultats del tractament per ICSI comparant el grup de pacients sense P2 detectable en comparació amb els pacients amb P2 (Carell i Liu, 2001).

Més recentment es descriu que els espermatozoides positius per a la tinció amb cromomicina A3, que indirectament indica una possible deficiència en protamines, presenten un percentatge de fertilització *in vitro* del 36,8%, xifra molt per sota de l'índex assolit (64,6%) amb els espermatozoides negatius per a la tinció amb aquest colorant (Nasr-Esfahani *et al.*, 2004).

En un altre estudi s'intenta l'expressió dels gens de protamines P1 i P2 en espermàtides testiculars de pacients azoospermics biopsiats en tractament per ICSI (Mitchell *et al.*, 2005). Aquests autors troben una expressió més baixa de l'mRNA corresponent al gen de la protamina P1 en les parelles que no han aconseguit un embaràs en comparació amb les que sí que han aconseguit un embaràs (Mitchell *et al.*, 2005).

En el treball més recent i complet publicat en el moment de tancar la present revisió, troben que la reducció de la relació P1/P2 resulta en una dràstica reducció dels índexs de fertilització *in vitro* en comparació amb els pacients amb una relació P1/P2 normal o augmentada (Aoki *et al.*, 2005).

Part de l'explicació de la relació entre fertilització *in vitro* i deficiència de protamines podria venir d'una sèrie d'experiments de fertilització *in vitro* amb espermatozoides lesionats experimentalment tractats amb ditiotritol (DTT), com a procediment per trencar els ponts disulfur que estableixen l'estructura nucleoprotamina (Ahmadi i Ng, 1999a). Aquests autors troben que en els espermatozoides lesionats amb DTT la capacitat de fertilització *in vitro* és normal, però que, en canvi, presenten una disminució del desenvolupament postimplantació (Ahmadi i Ng,

1999a). En un altre article publicat pels mateixos autors descriuen que els espermatozoides tractats amb DTT presenten una dràstica reducció en la capacitat d'unió i de penetració de l'òocit en el test de penetració en hámster. Però, no obstant això, si es fa servir ICSI, els espermatozoides lesionats amb DTT assolixen fins i tot nivells més alts de formació de pronuclis i descondensació del cap de l'espermatozoide en comparació amb els controls, tot i que en aquest últim treball els autors no estudien el desenvolupament ulterior dels embrions (Ahmadi i Ng, 1999b).

VARIACIONS EN ELS NIVELLS DE TRANSCRITS DE PROTAMINES I INFERTILITAT EN L'HOME

En un dels primers treballs d'anàlisi de l'expressió de protamines en cèl·lules testiculars aïllades per citometria de flux es va descriure una absència completa de l'expressió del gen P2 en les espermàtides rodones (Ziyyat *et al.*, 1999). Fent servir biòpsies de testicle i hibridació *in situ* es va poder demostrar que les espermàtides rodones de pacients infèrtils presentaven nivells disminuïts dels missatgers de protamina 1 i de protamina 2 (Steger *et al.*, 2000, 2001). Addicionalment, en aquest treball es va observar que la relació entre nivells de mRNA corresponents al gen de la protamina 1 i els corresponents al gen de la protamina 2 mantenien una correlació amb la fertilitat dels pacients. El mateix grup va assolir resultats similars fent servir PCR a temps real (Steger *et al.*, 2003). Un altre grup independent també ha identificat alteracions en l'expressió dels gens de protamina en biòpsies de pacients azoospermics (Friel *et al.*, 2002).

Però la presència de mRNA corresponents als gens de protamines no solament pot ser detectada en testicle sinó també en l'espermatozoide madur, tant per tècniques de microxips (Miller *et al.*, 1999; Miller, 2000) com per la tècnica de RT-PCR (Lambard *et al.*, 2004). Un

fet interessant és que en aquest últim treball es varen detectar diferències en l'expressió del gen P1 en fraccions d'espermatozoides que diferien en la mobilitat i densitat procedents de donants normozoospermics (Lambard *et al.*, 2004). Aquest fet és coherent amb les dades prèvies que indiquen que fins i tot dins d'una ejaculació normal existeixen diferències en els nivells d'expressió de protamines entre les diferents cèl·lules.

POLIMORFISMES I MUTACIONS EN ELS GENS DE PROTAMINES

Tan aviat com es va observar la presència d'alteracions en els nivells de protamines en l'espermatozoide d'alguns pacients infèrtils es va proposar la possible presència de mutacions en els gens corresponents (Yebra *et al.*, 1993). Aquesta idea venia recolzada addicionalment pel coneixement que la manca de protamina P2 en el nucli de l'espermatozoide d'algunes espècies de mamífer tals com el porc o el toro era deguda a la presència de mutacions en els gens corresponents (Maier *et al.*, 1990). No obstant això, l'anàlisi mutacional preliminar del gen de la protamina no va mostrar la presència de mutacions patogèniques en cap dels quatre pacients amb nivells més alterats de relació P1/P2 (Yebra *et al.*, 1993). Però seguint amb aquest tipus d'estudis mutacionals es varen detectar diversos polimorfismes en els gens de protamines (Queralt *et al.*, 1993; Schnulle *et al.*, 1994). Anàlisis subsegüents molt més completes en trenta-sis pacients infèrtils que presentaven evidència d'alteracions de la cromatina de l'espermatozoide no varen detectar cap mutació en els gens de la protamina P1, P2 o en la proteïna de transició 1 (Schlicker *et al.*, 1994). En un altre tipus d'anàlisi que incloïa també l'estudi d'àmplies regions flanquejants dels gens es va trobar un canvi en dos de cinc individus afectes que afectava potencialment la regió de

contacte a la matriu nuclear (Kramer *et al.*, 1997).

Molt més recentment un grup japonès ha començat l'estudi mutacional dels gens de la protamina P1 i P2 en 226 pacients estèrils i en 270 barons de fertilitat provada (Tanaka *et al.*, 2003). En aquest cas es trobaren quatre polimorfismes (SNP) en la regió codificant del gen de P1 que no resulten en canvi d'aminoàcid, i un SNP (c248t) en el gen P2 que sí que causa un codó de terminació a la protamina. Els autors proposen que la terminació prematura de la traducció del gen de la protamina P2 en el pacient amb el canvi c248t seria la causa de la seva infertilitat (Tanaka *et al.*, 2003). En aquest mateix treball també es descriu la identificació d'un SNP a la regió 3' del gen P1 i de dos SNP en la *intro* del gen P2.

Malgrat que els estudis mutacionals previs (Yebra *et al.*, 1993; Schlicker *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 2003) suggerien que les mutacions de protamines devien ser causes molt rares d'infertilitat a l'home, en una comunicació al congrés de la Societat Americana d'Andrologia de 2005 es va presentar evidència de la presència de mutacions patogèniques en els gens de protamina en alguns pacients addicionals (Iguchi *et al.*, 2005). En aquest treball es varen estudiar trenta-quatre pacients infèrtils que presentaven un fenotip a l'espermatozoide semblant a l'assolit per la genoanul·lació dels gens de la protamina P1 o P2 al ratolí (Cho *et al.*, 2001, 2003). En concret, en aquest treball s'identifica una mutació en heterozigosi que produeix un canvi d'arginina a serina a la seqüència d'aminoàcids en dos pacients infèrtils independents. Aquest canvi crearia una nova diana de fosforilació en la protamina 1. A més, aquests autors identifiquen diversos canvis en la regió promotora que mereixen estudi addicional (Iguchi *et al.*, 2005).

**LLIÇONS APRESES
DELS MODELS EXPERIMENTALS:
RESULTATS DERIVATS
DELS MODELS TRANSGÈNICS
I GENOANULLACIONS
DE PROTAMINES I PROTEÏNES
DE TRANSICIÓ**

El primer model de ratolí transgènic per a una protamina va correspondre al del gen complet de la protamina 1 de ratolí marcat (Peschon *et al.*, 1987). Els ratolins resultants expressaven correctament la construcció introduïda en les espermatides rodones, cosa que indicava el bon reconeixement dels elements reguladors en el transgènic (Peschon *et al.*, 1987; Zambrowics *et al.*, 1993). A més, els ratolins eren fèrtils, cosa que indicava que petites variacions en el nivell d'expressió de la P1 eren compatibles amb una funció aparentment normal de l'espermatozoide (Peschon *et al.*, 1987). Línies de transgènics generats amb el promotor de la protamina 2 de ratolí acoblat a gens marcadors també recolzaren la idea que els elements reguladors de les construccions de protamines eren correctament reconeguts pels factors endògens i resultaven en una correcta expressió en l'estadi d'espermàtides rodones (Stewart *et al.*, 1999). Models subsegüents dissenyats per sobreexpressar prematurament o en excés el gen de la protamina 1 en ratolí indicaren que es produïa una condensació prematura de la cromatina nuclear, anomalies de la morfologia del cap i processament incomplet de la protamina P2 (Peschon *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1995).

Però el primer transgènic d'expressió heteròloga d'una protamina va correspondre a la sobreexpressió de la protamina de gallina en ratolins, i resultava en una disrupció de la cromatina de l'espermatozoide (Rhim *et al.*, 1995). No obstant això, encara que no era previsible, aquest tipus de ratolins varen resultar fèrtils, fet que va permetre postular que un empaquetament molt precís del DNA de les cèl·lules germinals no seria essencial per a

la descondensació i formació del pronucli en els oòcits fecundats (Rhim *et al.*, 1995). Estudis subsegüents varen caracteritzar en detall les anomalies en l'espermatozoide d'aquests ratolins i varen confirmar la seva fertilitat relativa (Maleszewski *et al.*, 1998). La sobreexpressió del *cluster* de gens de protamina humans en ratolí va demostrar una conservació del patró temporal d'expressió, cosa que indicava que els elements reguladors eren reconeguts pels factors de transcripció de ratolí (Stewart *et al.*, 1999).

Però un treball subsegüent en el qual es varen generar genoanullacions del gen de la P1 o del gen de la P2 va demostrar que els ratolins genoanullats per a només un dels al·lels de la P1 o de la P2 eren infèrtils (Cho *et al.*, 2001). Atès que les protamines s'expressen en les fases haploides (Oliva *et al.*, 1988) es podria pensar que la disrupció d'un al·lel no hauria d'afectar l'expressió del gen de protamina en l'altra meitat de cèl·lules que tenen el gen normal. Però és conegut que la citocinesi és incompleta en les cèl·lules espermatogèniques, que queden connectades per ponts citoplasmàtics que poden permetre a les espermatides compartir mRNA (Braun *et al.*, 1989). Uns anys més tard aquests mateixos autors varen detectar la presència de lesió en el DNA dels espermatozoides d'aquests ratolins infèrtils (Cho *et al.*, 2003). De rellevància també, varen observar que si es feia servir la tècnica d'ICSI s'aconseguien activar els oòcits de ratolí, però pocs podien desenvolupar-se fins a l'estadi de blastocist (Cho *et al.*, 2003). Cal esmentar que un fenomen similar s'ha descrit en molts pacients infèrtils amb el DNA lesionat sotmesos a tractament per ICSI.

Un altre tipus de model extensament estudiat correspon als ratolins genoanullats per als gens de les proteïnes de transició 1 o 2 (Adham *et al.*, 2001; Meistrich *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004; Suganuma *et al.*, 2005). En els genoanullats dobles per a les dues proteïnes de transició el remodelament de la morfologia nuclear, la repressió de la transcripció, la desaparició de

les histones i la deposició de protamines resulta relativament normal. No obstant això, es va observar que la condensació de la cromatina resultava irregular, que la protamina P2 no resultava processada i que moltes de les espermatides allargades presentaven trencaments en el DNA (Zhao *et al.*, 2004).

INTERACCIÓ DE LES PROTAMINES AMB METALLS I FUNCIÓ REPRODUCTIVA

A causa de la seva naturalesa, les protamines no solament formen interaccions electrostàtiques amb el DNA, sinó que també tenen el potencial d'unir-se amb metalls o altres agents, tant formant part de la fisiologia normal com resultant en alteracions potencials de la cromatina. Una de les primeres observacions que va estimular l'estudi de la possible associació entre protamines i un metall va ser l'observació que el zinc és molt abundant en el nucli de l'espermatozoide (Morisawa i Mori, 1972). Diversos estudis subsegüents corroboraren aquestes observacions inicials i varen proposar que el zinc a l'espermatozoide podria estabilitzar la cromatina a través de la seva unió a grups tiol que no participessin en la formació de ponts disulfur. L'observació que les protamines P2 podien ser proteïnes del tipus *zinc finger* amb un Cys2/His2 va obrir noves perspectives per avançar en la comprensió de la seva funció (Bianchi *et al.*, 1992, 1994; Bal *et al.*, 2001). La quantificació per PIXIE dels nivells de zinc en espermatozoides de diverses espècies va demostrar que el contingut de zinc és proporcional a la quantitat de protamina P2, cosa que indica que aquest metall s'uniria de forma estequiomètrica a aquesta protamina (Bench *et al.*, 2000) en una relació 1:1. La interacció entre el zinc i la protamina P2 tindria, doncs, un paper important en la funció normal de l'espermatozoide, i tant la seva deficiència com el seu excés podria causar alteracions (El-Tawil,

2003; Piao *et al.*, 2003; Matsuda i Watanabe, 2003).

Però a part de la presència fisiològica de zinc a l'espermatozoide, existeix una clara evidència de la presència tòxica de metalls pesants tals com el plom, el coure o el níquel, i la seva toxicitat podria ser tant directa com a través de la seva interacció amb la protamina P2 (Johansson i Pellicciari, 1988; Quintanilla-Vega *et al.*, 2000a, 2000b; Hernández-Ochoa *et al.*, 2005; Bal *et al.*, 1997a, 1997b, 2000; Liang *et al.*, 1999). L'associació entre aquests metalls i la infertilitat a l'home és clara i els mecanismes estan essent investigats molt activament. A part dels metalls pesants, altres contaminants, tal com els pesticides, també tenen el potencial d'alterar l'estructura de la cromatina de l'espermatozoide. En el cas del Diazinon s'ha trobat que el mecanisme tòxic podria estar mitjançat a través de l'alteració de la fosforilació de les protamines (Piña-Guzman *et al.*, 2005).

PERSPECTIVES DE FUTUR

La recerca en el camp de la relació entre les protamines i la infertilitat es troba ara en un moment candent, però queden moltes qüestions per resoldre. Fonamentalment queda encara per resoldre quin és el mecanisme del reemplaçament nucleohistona-nucleoprotamina, i quines altres proteïnes, a part de les protamines, queden en el nucli de l'espermatozoide i per què. Manquen també dades que ajudin a comprendre millor la funció de les protamines. En l'àmbit més aplicat caldrà aprofundir més si les alteracions de les protamines de l'espermatozoide són, per si soles, causa directa de la infertilitat independentment del seu origen etiològic, o bé si les alteracions de les protamines són conseqüència de la causa etiològica però per si soles no afectarien la fertilitat. Formant part de l'escomesa d'aquesta qüestió caldrà també acabar d'explicar quina és la relació entre presència de trencaments

ments en el DNA, alteracions en els nivell de protamines en l'espermatozoide, canvis epigenètics i infertilitat. A més, aquest aspecte pot tenir transcendència per al potencial de transmissió de lesions del genoma a futures generacions. També falta per aclarir el possible paper de les mutacions i dels polimorfismes dels gens de protamines trobats en alguns pacients, i com aquests últims poden afectar la relació de protamines en els espermatozoides. Serà també interessant determinar fins a quin punt la presència de mutacions genètiques o factors de risc genètic en altres gens associats a infertilitat altera l'expressió de les protamines. En aquesta revisió també s'ha posat de manifest que factors ambientals o exògens tals com la presència de contaminants o l'estrès tèrmic poden afectar l'estructura de la cromatina de l'espermatozoide en un procés on també participen les protamines. Per tant, possiblement també s'acabi estudiant la interacció entre factors genètics i ambientals en la determinació de la maduresa molecular i la normalitat del nucli de l'espermatozoide. És previsible que les eines actuals de la genòmica, transcripciómica i proteòmica contribueixin a detectar proteïnes i factors implicats en la remodelació normal del nucli de l'espermatozoide i en la identificació dels mecanismes patològics que resulten en infertilitat.

AGRAÏMENTS

Els treballs recents del nostre grup citats en aquesta revisió han estat finançats per projectes del Ministeri de Ciència i Tecnologia (BMC2003-03937), fons FEDER, Ministeri de Sanitat i Consum V-2003-REDC07A-O i per l'ajut de la Generalitat de Catalunya (2001SGR00382) als grups consolidats. S'agraeix la revisió crítica del treball feta pel professor Cristóbal Mezquita.

BIBLIOGRAFIA

- ADHAM, I. M.; NAYERNA, K.; BURKHARDT-GOTTGES, E.; TOPALOGLU, O.; DIXKENS, C.; HOLSTEIN, A. F.; ENGEL, W. (2001). «Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2)». *Mol. Hum. Reprod.*, 7: 513-520.
- AHMADI, A.; NG, S. C. (1999a). «Developmental capacity of damaged spermatozoa». *Hum. Reprod.*, 14: 2279-2285.
- (1999b). «Destruction of protamine in human sperm inhibits sperm binding and penetration in the zona-free hamster penetration test but increases sperm head decondensation and male pronuclear formation in the hamster-ICSI assay». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 16: 128-132.
- AOKI, V. W.; CARRELL, D. T. (2003). «Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility». *Asian J. Androl.*, 5: 315-324.
- AOKI, V. W.; LIU, L.; CARRELL, D. T. (2005). «Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males». *Hum. Reprod.*, 20: 1298-1306.
- ARKHIS, A.; MARTINAGE, A.; SAUTIERE, P.; CHEVAILLIER, P. (1991). «Molecular structure of human protamine P4 (HP4), a minor basic protein of human sperm nuclei». *Eur. J. Biochem.*, 200: 387-392.
- BACH, O.; GLANDER, H. J.; SCHOLZ, G.; SCHWARZ, J. (1990). «Electrophoretic patterns of spermatozoal nucleoproteins (NP) in fertile men and infertility patients and comparison with NP of somatic cells». *Andrologia*, 22: 217-224.
- BAL, W.; DYBA, M.; SZEWCUK, Z.; JEZOWSKA-BOJCZUK, M.; LUKSZO, J.; RAMAKRISHNA, G.; KASPRZAK, K. S. (2001). «Differential zinc and DNA binding by partial peptides of human protamine HP2». *Mol. Cell. Biochem.*, 222: 97-106.
- BAL, W.; JEZOWSKA-BOJCZUK, M.; KASPRZAK, K. S. (1997). «Binding of nickel(II) and copper(II) to the N-terminal sequence of human protamine HP2». *Chem. Res. Toxicol.*, 10: 906-914.
- BAL, W.; LUKSZO, J.; KASPRZAK, K. S. (1997). «Mediation of oxidative DNA damage by nickel(II) and copper(II) complexes with the N-terminal sequence of human protamine HP2». *Chem. Res. Toxicol.*, 10: 915-921.
- BAL, W.; WOJCIK, J.; MACIEJCZYK, M.; GROCHOWSKI, P.; KASPRZAK, K. S. (2000). «Induction of a secondary structure in the N-terminal pentadecapeptide of human protamine HP2 through Ni(II) coordination. An NMR study». *Chem. Res. Toxicol.*, 13: 823-830.
- BALHORN, R.; REED, S.; TANPHAICHITR, N. (1988). «Aberant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males». *Experientia*, 44: 52-55.
- BELOKOPYTOVA, I. A.; KOSTYLEVA, E. I.; TOMILIN, A. N.; VOROBEV, V. I. (1993). «Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin». *Mol. Reprod. Dev.*, 34: 53-57.
- BENCH, G.; CORZETT, M. H.; YEBRA, L.; OLIVA, R.; BAL-

- HORN, R. (1998). «Protein and DNA contents in sperm from an infertile human male possessing protamine defects that vary over time». *Mol. Reprod. Dev.*, 50: 345-353.
- BENCH, G.; CORZETT, M. H.; KRAMER, C. E.; GRANT, P. G.; BALHORN, R. (2000). «Zinc is sufficiently abundant within mammalian sperm nuclei to bind stoichiometrically with protamine 2». *Mol. Reprod. Dev.*, 56: 512-519.
- BENCH, G. S.; FRIZ, A. M.; CORZETT, M. H.; MORSE, D. H.; BALHORN, R. (1996). «DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects». *Cytometry*, 23: 263-271.
- BIANCHI, F.; ROUSSEAU-PREVOST, R.; BAILLY, C.; ROUSSEAU, J. (1994). «Interaction of human P1 and P2 protamines with DNA». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201: 1197-1204.
- BIANCHI, F.; ROUSSEAU-PREVOST, R.; HUBLAU, P.; ROUSSEAU, J. (1994). «Interaction of mammalian sperm nuclear protamines and peptides derived thereof with immobilized zinc». *Int. J. Pept. Protein Res.*, 43: 410-416.
- BIANCHI, F.; ROUSSEAU-PREVOST, R.; SAUTIERE, P.; ROUSSEAU, J. (1992). «P2 protamines from human sperm are zinc-finger proteins with one CYS2/HIS2 motif». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182: 540-547.
- BLANCHARD, Y.; LESCOAT, D.; LE LANNOU, D. (1969). «Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa». *Andrologia*, 22: 549-555.
- BLOCH, D. P. (1969). «A catalog of sperm histones». *Genetics*, 61 (supl.): 93-111.
- BRAUN, R. E.; BEHRINGER, R. R.; PESCHON, J. J.; BRINSTER, R. L.; PALMITER, R. D. (1989). «Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid». *Nature*, 26(337): 373-376.
- CARRELL, D. T.; LIU, L. (2001). «Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis». *J. Androl.*, 22: 604-610.
- CHEVAILLIER, P.; MAURO, N.; FENEUX, D.; JOUANNET, P.; DAVID, G. (1987). «Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men». *Lancet*, 2: 806-807.
- CHO, C.; JUNG-HA, H.; WILLIS, W. D.; GOULDING, E. H.; STEIN, P.; XU, Z.; SCHULTZ, R. M.; HECHT, N. B.; EDDY, E. M. (2003). «Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice». *Biol. Reprod.*, 69: 211-217.
- CHO, C.; WILLIS, W. D.; GOULDING, E. H.; JUNG-HA, H.; CHOI, Y. C.; HECHT, N. B.; EDDY, E. M. (2001). «Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice». *Nat. Genet.*, 28: 82-86.
- CLARK, A. G.; CIVETTA, A. (2000). «Evolutionary biology. Protamine wars». *Nature*, 403: 261-263.
- COLLEU, D.; LESCOAT, D.; GOURANTON, J. (1996). «Nuclear maturity of human spermatozoa selected by swim-up or by Percoll gradient centrifugation procedures». *Fertil. Steril.*, 65: 160-164.
- EL-TAWI, A. M. (2003). «Zinc deficiency in men with Crohn's disease may contribute to poor sperm function and male infertility». *Andrologia*, 35: 337.
- EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; CORZETT, M.; BALHORN, R. (2000). «Characteristics of human chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study». *J. Androl.*, 21: 739-746.
- FRIEL, A.; HOUGHTON, J. A.; GLENNON, M.; LAVERY, R.; SMITH, T.; NOLAN, A.; MAHER, M. (2002). «A preliminary report on the implication of RT-PCR detection of DAZ, RBMY1, USP9Y and Protamine-2 mRNA in testicular biopsy samples from azoospermic men». *Int. J. Androl.*, 25: 59-64.
- GUSSE, M.; SAUTIERE, P.; BELAICHE, D.; MARTINAGE, A.; ROUX, C.; DADOUNE, J. P.; CHEVAILLIER, P. (1986). «Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm». *Biochim. Biophys. Acta*, 884: 124-134.
- HERNANDEZ-OCHOA, I.; GARCIA-VARGAS, G.; LOPEZ-CARRILLO, L.; RUBIO-ANDRADE, M.; MORAN-MARTINEZ, J.; CEBRIAN, M. E.; QUINTANILLA-VEGA, B. (2005). «Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in northern Mexico». *Reprod. Toxicol.*, 20: 221-228.
- IUCHI, Y.; KANEKO, T.; MATSUI, S.; SASAGAWA, I.; FIJII, J. (2003). «Concerted changes in the YB2/Ryb-a Protein and Protamine 2 messenger RNA in the mouse testis under heat stress». *Biol. Reprod.*, 68: 129-135.
- IGUCHI, N.; YANG, S.; LAMB, D.; HECHT, N. B. (2005). «A mutation in the protamine 1 gene of two infertile men creates a putative new site for phosphorylation». ASA 30th Annual Meeting «Androgens and Their Target Organs», Seattle, Washington, EUA.
- JOHANSSON, L.; PELLICCIARI, C. E. (1988). «Lead-induced changes in the stabilization of the mouse sperm chromatin». *Toxicology*, 51: 11-24.
- KHARA, K. K.; VLAD, M.; GRIFFITHS, M.; KENNEDY, C. R. (1997). «Human protamines and male infertility». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 14: 282-290.
- KOSSEL, A. (1928). *The protamines and histones*. Londres: Longmans Green.
- KRAMER, J. A.; ZHANG, S.; YARON, Y.; ZHAO, Y.; KRAWETZ, S. A. (1997). «Genetic testing for male infertility: a postulated role for mutations in sperm nuclear matrix attachment regions». *Genet. Test.*, 1: 125-129.
- LAMBARD, S.; GALERAUD-DENIS, I.; MARTIN, G.; LEVY, R.; CHOCAT, A.; CARREAU, S. (2004). «Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation». *Mol. Hum. Reprod.*, 10: 535-541.
- LEE, K.; HAUGEN, H. S.; CLEGG, C. H.; BRAUN, R. E. (1995). «Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 12451-12455.
- LEWIS, J. D.; SAPERAS, N.; SON, Y.; ZAMORA, M. J.; CHIVA, M.; AUSIO, J. (2004). «Histone H1 and the origin of protamines». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 4148-4152.
- LEWIS, J. D.; SONG, Y.; DE JONG, M. E.; BAGHA, S. M.;

- AUSIO, J. (2003). «A walk through vertebrate and invertebrate protamines». *Chromosoma*, 111: 473-482.
- LIANG, R.; SENTURKER, S.; SHI, X.; BAL, W.; DIZDAROGLU, M.; KASPRZAK, K. S. (1999). «Effects of Ni(II) and Cu(II) on DNA interaction with the N-terminal sequence of human protamine P2: enhancement of binding and mediation of oxidative DNA strand scission and base damage». *Carcinogenesis*, 20: 893-898.
- LOVE, C. C.; KENNEY, R. M. (1999). «Scrotal stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion». *Biol. Reprod.*, 60: 615-620.
- MAIER, W. M.; NUSSBAUM, G.; DOMENJOU, L.; KLEMM, U.; ENGEL, W. (1990). «The lack of protamine 2 (P2) in boar and bull spermatozoa is due to mutations within the P2 gene». *Nucleic Acids Res.*, 18: 1249-1254.
- MALESZEWSKI, M.; KURETAKE, S.; EVENSON, D.; YANAGIMACHI, H.; BJORDAHL, J.; YANAGIMACHI, R. (1998). «Behavior of transgenic mouse spermatozoa with galline protamine». *Biol. Reprod.*, 58: 8-14.
- MATSUDA, Y.; WATANABE, T. (2003). «Effects of oyster extract on the reproductive function of zinc-deficient mice: bioavailability of zinc contained in oyster extract». *Conogenit. Anom. (Kyoto)*, 43: 271-279.
- MEISTRICH, M. L.; MOHAPATRA, B.; SHIRLEY, C. R.; ZHAO, M. (2003). «Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis». *Chromosoma*, 111: 483-488.
- MENGUAL, L.; BALLESCA, J. L.; ASCASO, C.; OLIVA, R. (2003). «Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls». *J. Androl.*, 24: 438-447.
- MEZQUITA, C. (1985). «Chromatin composition, structure and function in spermatogenesis». *Revis. Biol. Celular.*, 5(5-14): 1-124.
- MEZQUITA, C.; TENG, C. S. (1977). «Studies on sex-organ development. Changes in nuclear and chromatin composition and genomic activity during spermatogenesis in the maturing rooster testis». *Biochem. J.*, 164: 99-111.
- MILLER, D. (2000). «Analysis and significance of messenger RNA in human ejaculated spermatozoa». *Mol. Reprod. Dev.*, 56: 259-264.
- MILLER, D.; BRIGGS, D.; SNOWDEN, H.; HAMLINGTON, J.; ROLLINSON, F.; LILFORD, R.; KRAWETZ, S. A. (1999). «A complex population of RNAs exists in human ejaculated spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermatogenesis». *Gene*, 237: 385-392.
- MITCHELL, V.; STEGER, K.; MARCHETTI, C.; HERBAUT, J. C.; DEVOS, P.; RIGOT, J. M. (2005). «Cellular expression of protamine 1 and 2 transcripts in testicular spermatids from azoospermic men submitted to TESE-ICSI». *Mol. Hum. Reprod.*, 11: 373-379.
- MORISAWA, M.; MORI, H. (1972). «Heavy metals and spermatozoan motility. I. Distribution of iron, zinc and copper in sea urchin spermatozoa». *Exp. Cell. Res.*, 70: 311-316.
- NASR-ESFAHANI, M. H.; SALEHI, M.; RAZAVI, S.; MARDANI, M.; BAHRAMIAN, H.; STEGER, K.; OREIZI, F. (2004). «Effect of protamine-2 deficiency on ICSI outcome». *Reprod. Biomed. Online*, 9: 652-658.
- OLIVA, R. (1995). «Sequence, evolution and transcriptional regulation of mammalian P1 type protamines». A: JAMIESON, B. G. M.; AUSIÓ, J.; JUSTINE, J. L. [ed.] *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mem. Mus. Natn. Hist. Nat.*, 166: 537-548.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction». *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.*, 40: 25-94.
- OLIVA, R.; MEZQUITA, J.; MEZQUITA, C.; DIXON, G. H. (1988). «Haploid expression of the rooster protamine mRNA in the postmeiotic stages of spermatogenesis». *Dev. Biol.*, 125: 332-340.
- PESCHON, J. J.; BEHRINGER, R. R.; BRINSTER, R. L.; PALMITER, R. D. (1987). «Spermatid-specific expression of protamine 1 in transgenic mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5316-5319.
- PESCHON, J. J.; BEHRINGER, R. R.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L. (1989). «Expression of mouse protamine 1 genes in transgenic mice». *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 564: 186-197.
- PIAO, F.; YOKOYAMA, K.; MA, N.; YAMAUCHI, T. (2003). «Subacute toxic effects of zinc on various tissues and organs of rats». *Toxicol. Lett.*, 145: 28-35.
- PINA-GUZMAN, B.; SOLIS-HEREDIA, M. J.; QUINTANILLA-VEGA, B. (2005). «Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines». *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 202: 189-198.
- QUERALT, R.; ADROER, R.; OLIVA, R.; WINKFEIN, R. J.; RETIEF, J. D.; DIXON, G. H. (1995). «Evolution of protamine P1 genes in mammals». *J. Mol. Evol.*, 40: 601-607.
- QUERALT, R.; FABREGUES-BOIXAR, O. DE; ADROER, R.; GENE, M.; GOMEZ-CATALAN, J.; HUGUET, E.; OLIVA, R. (1993). «Direct sequencing of the human protamine P1 gene and application in forensic medicine». *J. Forensic Sci.*, 38: 1491-1501.
- QUINTANILLA-VEGA, B.; HOOVER, D.; BAL, W.; SILBERGELD, E. K.; WAALKES, M. P.; ANDERSON, L. D. (2000a). «Lead effects on protamine-DNA binding». *Am. J. Ind. Med.*, 38: 324-329.
- (2000b). «Lead interaction with human protamine (HP2) as a mechanism of male reproductive toxicity». *Chem. Res. Toxicol.*, 13: 594-600.
- RHIM, J. A.; CONNOR, W.; DIXON, G. H.; HARENDZA, C. J.; EVENSON, D. P.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L. (1995). «Expression of an avian protamine in transgenic mice disrupts chromatin structure in spermatozoa». *Biol. Reprod.*, 52: 20-32.
- SCHNULLE, V.; SCHLICKE, M.; ENGEL, W. (1994). «A (GA)_n repeat polymorphism in the human protamine 2 (PRM 2) gene». *Hum. Mol. Genet.*, 3: 1445.
- SCHLICKE, M.; SCHNULLE, V.; SCHNEPPEL, L.; VOROB'EV, V. I.; ENGEL, W. (1994). «Disturbances of nuclear condensation in human spermatozoa: search for mutations in the genes for protamine 1: protamine 2 and transition protein 1». *Hum. Reprod.*, 9: 2313-2317.

- SILVESTRONI, L.; FRAJESE, G.; FABRIZIO, M. (1976). «Histones instead of protamines in terminal germ cells of infertile: oligospermic men». *Fertil. Steril.*, 27: 1428-1437.
- STEGER, K.; FAILING, K.; KLONISCH, T.; BEHRE, H. M.; MANNING, M.; WEIDNER, W.; HERTLE, L.; BERGMANN, M.; KLIESCH, S. (2001). «Round spermatids from infertile men exhibit decreased protamine-1 and -2 mRNA». *Hum. Reprod.*, 16: 709-716.
- STEGER, K.; FINK, L.; FAILING, K.; BOHLE, R. M.; KLIESCH, S.; WEIDNER, W.; BERGMANN, M. (2003). «Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men». *Mol. Hum. Reprod.*, 9: 331-336.
- STEGER, K.; FINK, L.; KLONISCH, T.; BOHLE, R. M.; BERGMANN, M. (2002). «Protamine-1 and -2 mRNA in round spermatids is associated with RNA-binding proteins». *Histochem. Cell. Biol.*, 117: 227-234.
- STEGER, K.; PAULS, K.; KLONISCH, T.; FRANKE, F. E.; BERGMANN, M. (2000). «Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis». *Mol. Hum. Reprod.*, 6: 219-225.
- STEWART, K. S.; KRAMER, J. A.; EVANS, M. I.; KRAWETZ, S. A. (1999). «Temporal expression of the transgenic human protamine gene cluster». *Fertil. Steril.*, 71: 739-745.
- SUBIRANA, J. A. (1982). A: ANDRE, J. [ed.] *Proceedings of the forth international symposium of spermatogly*. La Haia: Nijhoff, p. 197-213.
- SUGANUMA, R.; YANAGIMACHI, R.; MEISTRICH, M. L. (2005). «Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI». *Hum. Reprod.* [En premsa]
- TANAKA, H.; MIYAGAWA, Y.; TSUJIMURA, A.; MATSUMIYA, K.; OKUYAMA, A.; NISHIMUNE, Y. (2003). «Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations». *Mol. Hum. Reprod.*, 9: 69-73.
- WYCKOFF, G. J.; WANG, W.; WU, C. I. (2000). «Rapid evolution of male reproductive genes in the descent of man». *Nature*, 403: 304-309.
- YEBRA, L. DE; BALLESCA, J. L.; VANRELL, J. A.; BASSAS, L.; OLIVA, R. (1993). «Complete selective absence of protamine P2 in humans». *J. Biol. Chem.*, 268: 10553-10557.
- YEBRA, L. DE; BALLESCA, J. L.; VANRELL, J. A.; CORZETT, M.; BALHORN, R.; OLIVA, R. (1998). «Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels». *Fertil. Steril.*, 69: 755-759.
- YEBRA, L. DE; OLIVA, R. (1993). «Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins». *Anal. Biochem.*, 209: 201-203.
- ZAMBROWICZ, B. P.; HARENDZA, C. J.; ZIMMERMANN, J. W.; BRINSTER, R. L.; PALMITER, R. D. (1993). «Analysis of the mouse protamine 1 promoter in transgenic mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5071-5075.
- ZHAO, M.; SHIRLEY, C. R.; HAYASHI, S.; MARCON, L.; MOHAPATRA, B.; SUGANUMA, R.; BEHRINGER, R. R.; BOISSONNEAULT, G.; YANAGIMACHI, R.; MEISTRICH, M. L. (2004). «Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development». *Genesis*, 38: 200-213.
- ZIYYAT, A.; LASALLE, B.; TESTARD, J.; BRIOT, P.; AMAR, E.; FINAZ, C.; LEFEVRE, A. (1999). «Flow cytometry isolation and reverse-transcriptase chain reaction characterization of human round spermatidscin infertile patients». *Hum. Reprod.*, 14: 379-387.