

DINÁMICA DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DEL RESIDUO H4K5 EN LA CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE MADURO

Paula Jauregi^{1#}, Alberto de la Iglesia^{1#}, Ferran Barrachina¹, Lukas Ded², Carme Mallofré³, Josep Lluís Ballescà⁴, Meritxell Jodar¹, Judit Castillo^{1*}, Rafael Oliva^{1,5*}

¹ Grupo de Investigación de Biología Molecular de la Reproducción y el Desarrollo, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

² Laboratory of Diagnostics for Reproductive Medicine, Institute of Biotechnology, v.v.i., BIOCEV, Vestec, Czech Republic

³ Departamento de Patología, Universidad de Barcelona. Hospital Clínic, Barcelona, España

⁴ Instituto Clínico de Ginecología, Obstetricia y Neonatología, Hospital Clínic, Barcelona, España

⁵ Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, España

Igual contribución

*Autor de correspondencia: Judit Castillo. e-mail: juditcastillo@ub.edu; Rafael Oliva. e-mail: roliva@ub.edu

Resumen

Durante la última fase de la espermatogénesis humana se da la transición nucleohistona-nucleoprotamina (NH-NP), dando lugar a una estructura de la cromatina altamente condensada y esencial para la funcionalidad del espermatozoide. Sin embargo, esta remodelación de la cromatina no es completa, y alrededor del 5-15% de las histonas permanecen retenidas en el núcleo del espermatozoide humano maduro. Se sabe que las histonas pueden presentar modificaciones postraduccionales (MPTs), las cuales son esenciales para la regulación de la remodelación de la cromatina, como la conocida acetilación de lisinas (Kac) y la recientemente descubierta butirilación de lisinas (Kbu), las cuales compiten entre sí. Concretamente, la proteína BRDT (*Bromodomain testis-specific protein*) se une al residuo H4K5 acetilado (H4K5ac) y desencadena la transición NH-NP, pero cuando este residuo se encuentra butirilado (H4K5bu), BRDT no es capaz de reconocer el residuo y las histonas escapan de este reemplazo. Resultados no publicados de nuestro grupo en biopsias testiculares de pacientes con espermatogénesis normal han revelado altos niveles de ambas MPTs en los estadios de espermátida alargada, lo que apoyaría la hipótesis de un mecanismo dinámico entre H4K5bu y H4K5ac que controlaría la transición NH-NP. Sin embargo, en el presente estudio se ha detectado por primera vez tanto la presencia de H4K5bu como la distribución diferencial de H4K5ac y H4K5bu en el espermatozoide maduro de muestras de semen de individuos normozoospermicos, sugiriendo que estas MPTs podrían ser también de gran importancia una vez el espermatozoide ha fertilizado el oocito. Se ha determinado la relación H4K5bu/ac en muestras normales, tanto a nivel de seminograma como en la relación de protaminas, siendo la intensidad detectada de H4K5ac unas dos veces mayor que la detectada de H4K5bu en la mayoría de las muestras. En trabajos futuros, se pretende elucidar la posible función de estas modificaciones en el gameto masculino, descifrando su impacto en la estructura de la cromatina espermática, así como su posible papel como marca epigenética para el desarrollo embrionario temprano.

Palabras clave: H4K5bu, H4K5ac, cromatina espermática, transición NH-NP, inmunodetección, marca epigenética.

Abstract

During the last phase of the human spermatogenesis the nucleohistone to nucleoprotamine (NH-NP) transition takes place, giving rise to a unique highly condensed chromatin structure essential for sperm functionality. However, this chromatin remodeling is not complete, and around 5-15% of the histones remain retained in mature human sperm. It is known that histones carry post-translational modifications (PTMs) that are essential for the regulation of sperm chromatin remodeling, such as the well-known lysine acetylation (Kac) and the recently discovered lysine butyrylation (Kbu), which seems to compete for the same residue. Specifically, Bromodomain testis-specific protein (BRDT) binds to acetylated H4K5 (H4K5ac) and triggers the NH-NP transition. Therefore, when this residue is butyrylated (H4K5bu), BRDT is not capable of recognizing this acylation and, in consequence, histones escape from the NH-NP replacement. Unpublished results from our group have revealed high levels for both PTMs around the stages of elongated spermatids in testicular biopsies from patients with normal spermatogenesis, which support the hypothesis of a dynamic H4K5bu-

H4K5ac competing mechanism that regulates the NH-NP transition. In the current study, we have detected for the first time the presence of H4K5bu and a differential distribution of both H4K5ac and H4K5bu in mature sperm from normozoospermic semen samples, suggesting a function for both PTMs upon oocyte fertilization. Moreover, we have established the ratio of H4K5bu/ac in normal semen samples, being the H4K5ac signal intensity around twice higher than H4K5bu signal intensity in the majority of the samples. Future plans are focused on elucidating the potential function of these modifications in the male gamete, deciphering its impact in sperm chromatin structure as well as their possible role as epigenetic mark for the early embryo development.

Key words: H4K5bu, H4K5ac, sperm chromatin, NH-NP transition, immunodetection, epigenetic mark.

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides son células altamente especializadas producidas mediante un proceso de diferenciación celular denominado espermatogénesis. Este es un proceso conservado entre especies que puede dividirse en tres etapas: una primera fase de proliferación o mitótica, una fase meiótica y una última fase de diferenciación denominada espermiogénesis. En esta fase final tiene lugar la transición nucleohistona-nucleoprotamina (NH-NP) en todos los mamíferos y en otras muchas especies, un proceso en el que la mayoría de las histonas son intercambiadas por unas proteínas muy básicas y de bajo peso molecular, las protaminas, dando lugar a una cromatina altamente empaquetada en el espermatozoide (Oliva y Castillo, 2011; Bao *et al.*, 2016). Esta estructura confiere al núcleo del espermatozoide su característica morfología y permite la protección del genoma paterno durante el arduo viaje hasta el óvulo (Balhorn, 2007).

Se ha visto que el reemplazamiento NH-NP es secuencial, es decir, las histonas son inicialmente sustituidas por variantes de histona específicas de testículo (Govin *et al.*, 2004), seguido por proteínas de transición (TNPs) y, en última instancia, por protaminas (Oliva, 2006). Sin embargo, la eficiencia de este proceso no es completa y aproximadamente un 5-15% de las histonas permanecen en la cromatina del espermatozoide maduro humano (Oliva y Castillo, 2011).

La presencia de modificaciones postraduccionales (MPTs) tanto en histonas como en protaminas parecen ser cruciales para la correcta regulación de la transición NH-NP. Por ejemplo, para iniciar este proceso es necesaria una hiperacetilación de las histonas y su reconocimiento por la proteína *Bromodomain Testis-Specific Protein* (BRDT) (Oliva *et al.*, 1990; Morinière *et al.*, 2009). Sin embargo, en los últimos años se han descubierto nuevas acilaciones que también podrían jugar un papel importante en la regulación de la remodelación de la cromatina, como es el caso de la butirilación de lisinas (Kbu) (Gourdazi *et al.*, 2016; Sabari *et al.*, 2017). En ratón, se ha visto que el primer bromodominio de BRDT se une de manera específica a la lisina de la his-

tona H4 cuando está acetilada (H4K5ac), desencadenando la transición NH-NP (Goudarzi *et al.*, 2014). De forma contraria, la butirilación impide la unión de este bromodominio a H4K5, compitiendo así con la acetilación (Goudarzi *et al.*, 2016). Con estos resultados se ha propuesto un modelo de regulación temporal de la transición NH-NP, de tal forma que los nucleosomas que contienen el residuo H4K5 butirilado no serían reconocidos por BRDT y escaparían el reemplazamiento dependiente de la ola de hiperacetilación. Como consecuencia, la transición NH-NP en estos nucleosomas se produciría directamente, substituyéndose las histonas por protaminas sin la participación de las TNPs, dando lugar a toroides menos compactados (Figura 1). Resultados no publicados de nuestro grupo revelaron altos niveles de H4K5ac y H4K5bu en espermátidas elongadas de biopsias testiculares de pacientes con espermatogénesis normal, lo que apoyaría la hipótesis de un mecanismo dinámico entre ambas modificaciones que controlaría la transición NH-NP.

Sin embargo, la importancia de las MPTs de histonas no se limita a su papel regulador en el proceso espermatogénico. En los últimos años, se ha visto que la contribución del espermatozoide al cigoto incluye no solo el ADN paterno, sino también diferentes marcas epigenéticas, como la metilación del ADN y las MPTs de histonas y protaminas, así como proteínas y RNAs. Además, mediante la aplicación de técnicas de alto rendimiento en el estudio de la cromatina del espermatozoide maduro, se ha observado una distribución diferencial de los genes asociados a los dominios nucleohistona y nucleoprotamina, estando el dominio NH enriquecido en promotores de genes fundamentales para el desarrollo embrionario (Hammoud *et al.*, 2010; Castillo *et al.*, 2014 y 2015). Estas marcas epigenéticas se transmiten al óvulo en el momento de la fecundación, participando en la correcta formación y desarrollo del cigoto, así como en la herencia epigenética paterna.

Por tanto, el objetivo principal del presente estudio ha sido determinar si las MPTs H4K5ac y H4K5bu siguen presentes en el espermatozoide maduro, ya que la dinámica de estas MPTs podría constituir una marca epigenética potencial de cara al desarrollo embrionario

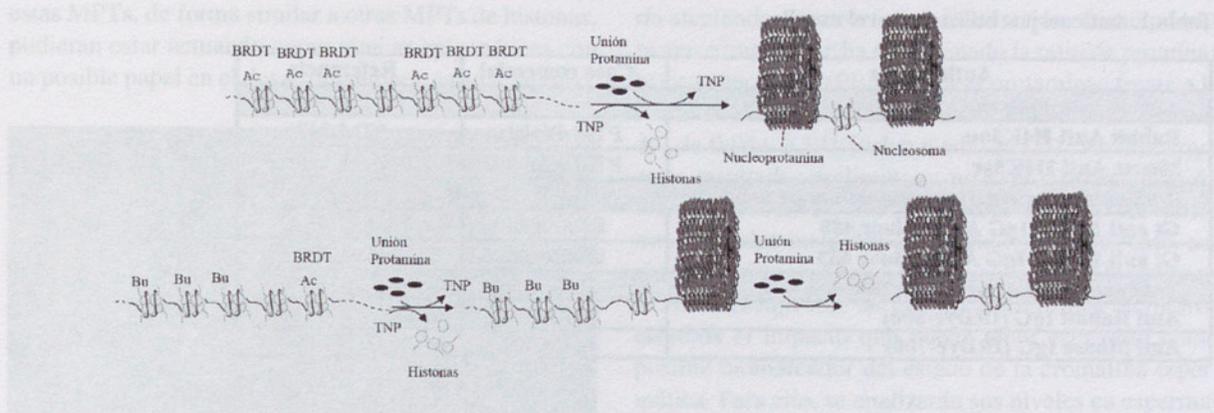


Figura 1. Regulación de la transición NH-NP por el mecanismo dinámico mediado por H4K5bu-H4K5ac. Cuando el residuo H4K5 está acetilado, la unión de BRDT desencadena la transición NH-NP; pero si el residuo está butirilado BRDT no se puede unir. Se ha propuesto un modelo de transición diferencial en el tiempo en el que las histonas de los nucleosomas con H4K5bu evitarían su reemplazamiento y serían reemplazadas de forma tardía directamente por protaminas, generando toroides menos compactados.

temprano. Adicionalmente, en caso de detectar la presencia de éstas MPTs en el espermatozoide maduro, se pretende establecer los niveles normales de ambas MPTs en pacientes normozoospermicos. La determinación del rango de referencia en estos pacientes nos permitiría identificar muestras que presenten alteraciones de estas MPTs, y así estudiar sus potenciales efectos en la estructura de la cromatina. Esto ayudaría a dilucidar si estas marcas epigenéticas en el espermatozoide maduro son remanentes de la espermatogénesis o si realmente pudieran tener un papel como marca epigenética en el desarrollo embrionario y en la herencia epigenética paterna.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Las muestras de semen utilizadas en el estudio fueron obtenidas de pacientes sometidos a un análisis rutinario de semen en la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Clínic de Barcelona, tras 3-5 días de abstinencia sexual y habiendo firmado un consentimiento informado. Los parámetros seminales fueron analizados mediante el sistema de análisis automático de semen CASA (Proiser, Paterna, España), y la vitalidad fue analizada siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010). Las muestras utilizadas fueron clasificadas como normozoospermicas (n=5). El uso del material biológico humano se ajustó a las directrices de la Junta de Revisión Interna y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic de Barcelona.

Procesamiento de muestras

Los espermatozoides fueron purificados mediante un gradiente de densidad al 50% utilizando Puresperm (Nidacon, Mölndal, Suecia), siguiendo el protocolo del fabricante. Tras la purificación, se determinó el porcentaje de contaminación por células somáticas (las muestras con más de un 1% de contaminación somática tras el gradiente fueron excluidas). Además, se extrajo el RNA de 5 millones de espermatozoides y se confirmó la ausencia del marcador específico de leucocitos (CD45) mediante RT-PCR, tal y como se indica en Jodar *et al.*, 2012.

Inmunofluorescencia mediante microscopía confocal

Se realizó una extensión de 1 millón de espermatozoides sobre un portaobjetos de adhesión con polilisina (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y se realizó una fijación en formaldehído 2% durante 40 minutos. Para espermatozoides con cromatina descondensada, previo a la fijación, se incubaron las células con 2,5 mM DTT, 0,2% Tritón X-100 y 100 UI/mL heparina en PBS, y se monitorizó la descondensación mediante un microscopio óptico. Una vez fijados los espermatozoides, se hicieron lavados de PBS y H₂O para posteriormente permeabilizar durante 20 minutos (0,05% Tritón X-100 en PBS). Tras dos lavados, los portaobjetos se incubaron con solución de bloqueo (5% BSA en PBS) un mínimo de 1h. La incubación con los anticuerpos primarios (ver Tabla 1) a dilución 1:100 en solución de bloqueo se realizó O/N a 4°C. Los anticuerpos secundarios (ver Tabla 1) diluidos 1:500 en solución de bloqueo se incubaron a temperatura ambiente

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en el estudio.

Anticuerpos	Casa comercial	Referencia
Anticuerpos primarios		
Rabbit Anti-H4K5bu	PTM-Biolabs	PTM-313
Mouse Anti-H4K5ac	PTM-Biolabs	PTM-163
Anticuerpos secundarios inmunofluorescencia		
Gt anti-Mouse IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen	A28175
Gt anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 633	Invitrogen	A21070
Anticuerpos secundarios WB Odyssey		
Anti Rabbit IgG (IRDye-800)	LI-COR	P/N 925-32211
Anti Mouse IgG (IRDye-700)	LI-COR	P/N 925-68070

durante 2 horas. Después de lavar 3 veces con PBS y 1 vez con H₂O, se procedió al montaje con Vectashield Mounting Medium con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía confocal (LSM880 ZEISS).

Extracción y cuantificación de proteínas

Se realizó una extracción tanto de proteína global como de proteínas básicas para cada una de las muestras incluidas en este estudio. La extracción global de proteínas se realizó mediante la lisis de espermatozoides purificados con 2% SDS, 1mM PMSF en PBS e incubación durante 15 minutos en hielo. Seguidamente, se cuantificó la proteína mediante el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), siguiendo el protocolo comercial. La extracción y cuantificación de proteínas básicas se realizaron a partir de 10⁷ espermatozoides siguiendo el protocolo descrito en Soler-Ventura *et al.*, 2018.

Western Blot de Fluorescencia (Odyssey®)

De cada muestra se separaron 10 µg de proteína global por SDS-PAGE mediante un gel al 16% de acrilamida (Castillo *et al.*, 2014). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,2µm de poro (Bio-Rad, Hercules, CA), previamente activada con metanol, en tampón de transferencia (200mM Glicina, 25mM Tris, 15% Metanol) con un amperaje constante de 100mA durante dos horas. A continuación, se lavó la membrana con etanol durante 15 segundos y se realizaron dos lavados con TBS (10mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,4). Se bloquearon las uniones inespecíficas de la membrana con solución de bloqueo comercial (Odyssey® Blocking Buffer, LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska) durante 1 hora y se incubaron los anticuerpos primarios (ver Tabla 1) diluidos 1:1.000 en solución de bloqueo y 1% de Tween-20 durante toda la noche a 4°C. Tras lavados con TBT (10mM Tris pH 8,0, 150mM

NaCl, 0.1% Tween), se incubó la membrana con los anticuerpos secundarios (ver Tabla 1) diluidos 1:12.000 en solución de bloqueo y 0,1% de Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavados con TBT y TBS, se fijó la membrana con metanol durante 3 minutos y se dejó secar durante un mínimo de 15 minutos. El revelado de la membrana se realizó usando el sistema de análisis de imagen infrarroja Odyssey® (LI-COR Biosciences). La determinación de las ratios para las H4K5bu/H4K5ac se realizó utilizando el software Image Studio Lite v5.2 (LI-COR Biosciences).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

H4K5bu y H4K5ac muestran distribuciones diferentes en espermatozoide humano maduro

Mediante microscopía confocal se ha detectado por primera vez H4K5bu en la cromatina del espermatozoide humano maduro (Figura 2). De forma relevante, se observa una distribución diferencial de ambas MPTs estudiadas, estando H4K5bu localizada en la zona apical de la cabeza, mientras que H4K5ac se observa en la parte más basal. Esta distribución se ha detectado en el 55,04% de las células (360/654 células) en una muestra con parámetros seminales normales (concretamente, con un 28% de formas normales y una movilidad progresiva del 86,59%), reflejando así la heterogeneidad intrínseca del semen. Además, este patrón diferencial de ambas MPTs también se observó en la cromatina descondensada de espermatozoides maduros de muestras normozoospermicas (datos no mostrados). La presencia de ambas MPTs en espermatozoide maduro implicaría la presencia de nucleosomas que, aun estando marcados, no se han reemplazado durante la transición NH-NP. Esto nos llevaría a pensar en dos posibilidades: 1) que la presencia de H4K5bu y H4K5ac son simples remanentes de la espermatogénesis, reflejando la incompleta eficiencia del intercambio NH-NP, y 2) que

estas MPTs, de forma similar a otras MPTs de histonas, pudieran estar actuando como marcas epigenéticas con un posible papel en el desarrollo embrionario temprano.

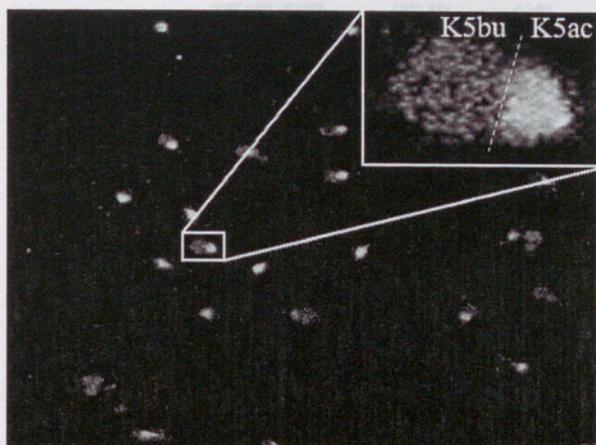


Figura 2. Detección por microscopía confocal de H4K5bu y H4K5ac en la cromatina de espermatozoide maduro. Distribución de ambas MPTs en la cromatina en condiciones nativas a 630X.

Niveles de H4K5ac y H4K5bu en espermatozoide maduro

Teniendo en cuenta la heterogeneidad observada mediante microscopía confocal, se procedió a estudiar la abundancia de estas modificaciones en pacientes normozoospermicos, en relación a sus parámetros seminales y a la protaminación representada por la relación P1/P2. La ratio P1/P2 de los pacientes estudiados fue de $1,008 \pm 0,166$ (valor medio \pm SD) con un intervalo de confianza (IC) del 95% de 0,801-1,214. El análisis cuantitativo de Western Blot (Figura 3) muestra que la acetilación está presente en el residuo H4K5 de manera más abundante que la butirilación, presentando una ratio H4K5bu/H4K5ac de $0,453 \pm 0,105$ (valor medio \pm SD) y un IC del 95% de 0,322-0,583 (Tabla 2). Es destacable que la ratio H4K5bu/H4K5ac no se mantiene dentro del IC en el paciente 1, a pesar de presentar parámetros seminales normales con ratio P1/P2 dentro del rango de normalidad. Además, el paciente 5 tiene una ratio P1/P2 por debajo del IC y sí que presenta una ratio H4K5bu/H4K5ac dentro de su IC. Por lo tanto, una alteración en la ratio H4K5bu/H4K5ac no implicaría una alteración en la ratio P1/P2. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la ratio P1/P2 no refleja la distribución de la cromatina del espermatozoide en los dominios NH y NP. Así, es necesario analizar más a fondo la estructura de la cromatina espermática, para comprobar si una ratio H4K5bu/H4K5ac alterado esta-

ría afectando su estructura y distribución. Como primera aproximación se ha determinado la ratio de proteínas básicas nucleares (PBN) excepto protaminas frente a la totalidad de éstas (P1/P2), obteniendo un valor promedio de $0,94 \pm 0,391$ (valor medio \pm SD). Sin embargo, estos resultados preliminares no muestran una relación clara con los niveles de H4K5bu/H4K5ac en las muestras normales incluidas en el estudio. Por lo tanto, serían necesarios más estudios focalizados en la cromatina. Este trabajo abre las puertas a determinar en futuros estudios el impacto que puede tener esta ratio como posible biomarcador del estado de la cromatina espermática. Para ello, se analizarán sus niveles en espermatozoides de muestras teratozoospermicas con alteraciones morfológicas exclusivamente de cabeza y también en espermatozoides seleccionados mediante el método utilizado en la clínica a la hora de realizar técnicas de reproducción asistida. Adicionalmente, se determinarán las regiones del genoma asociadas a ambas modificaciones con tal de explorar su posible función como marca epigenética.

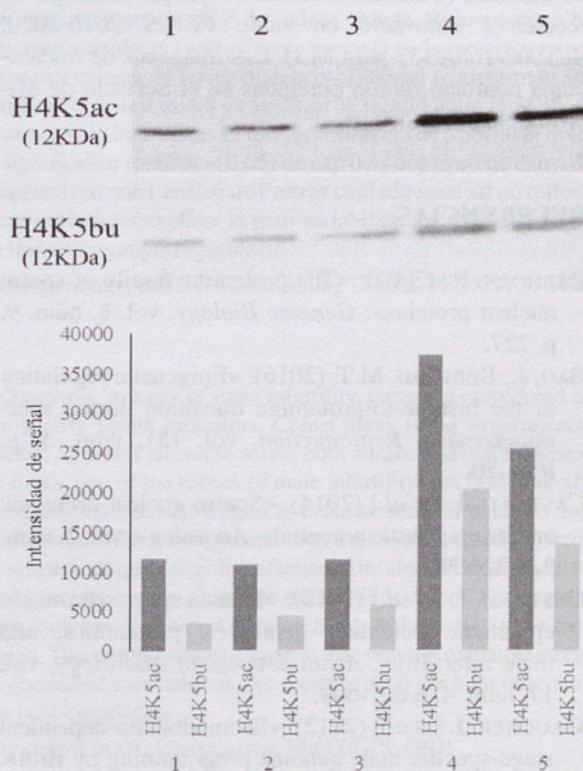


Figura 3. Western Blot de Fluorescencia de H4K5bu y H4K5ac en espermatozoides maduros de pacientes normozoospermicos. A) H4K5ac (en la parte superior), H4K5bu (en la parte inferior). B) Intensidad de la señal de H4K5ac (gris oscuro) y H4K5bu (gris claro) detectada para cada muestra. El eje Y representa la intensidad de la señal detectada por el programa de análisis.

Tabla 2. Parámetros del seminograma y ratios analizados en el estudio: P1/P2, H4K5bu/H4K5ac y proteínas básicas nucleares (excepto protaminas) frente a la totalidad de protaminas (PBN/P1P2) de las 5 muestras utilizadas para el estudio.

MUESTRA	[] (MZ/ML)	A (%)	B (%)	C (%)	FN (%)	RATIO P1/P2	RATIO PBN/P1P2	H4K5bu/ H4K5ac
1	150	45	36	7,5	14	1,15	0,50	0,29
2	128,6	15,7	34,3	8,6	21	1,00	1,02	0,40
3	82,4	38	21	6,4	16	1,155	1,54	0,49
4	114,68	20,63	58,37	7,02	25	0,97	0,94	0,54
5	152,9	25,3	31,9	8,8	22	0,75	0,71	0,53

AGRADECIMIENTOS

Este estudio está subvencionado a cargo del proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad (PI16/00346 para R.O, FI17/00224 para A.I y CD17/00109 para J.C.), del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte para la Formación de Profesorado Universitario (FPU15/02306 para F.B) y del Gobierno de Cataluña (Generalitat de Catalunya, pla estratègic de recerca i innovació en salut, PERIS 2016-2020, SLT002/16/00337 para M.J). Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas en el Servicio de Microscopía del CCiTUB.

REFERENCIAS

- BALHORN, R. (2007). «The protamine family of sperm nuclear proteins». *Genome Biology*, vol. 8, núm. 9, p. 227.
- BAO, J., BEDFORD, M.T. (2016). «Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis». *Reproduction*, vol. 151, núm. 5, p. R55–70.
- CASTILLO, J. [et al.] (2014). «Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential». *Andrology*, vol. 2, núm. 3, p.326-38.
- CASTILLO, J. [et al.] (2015). «Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility». *Asian Journal of Andrology*, vol. 17, núm. 4, p.601-609.
- GAUCHER, J. [et al.] (2012). «Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt». *The EMBO Journal*, vol. 31, núm. 19, p.3809-3820.
- GOUDARZI, A. [et al.] (2014). «Genome-scale acetylation-dependent histone eviction during spermatogenesis». *Journal of Molecular Biology*, vol. 426, núm. 20, p. 3342–3349.
- GOUDARZI, A. [et al.] (2016). «Dynamic Competing Histone H4 K5K8 Acetylation and Butyrylation Are Hallmarks of Highly Active Gene Promoters». *Molecular Cell*, vol. 62, núm. 2, p. 169-180.
- GOVIN, J. [et al.] (2004). «The role of histones in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis». *European Journal of Biochemistry*, vol. 271, núm. 17, p.3459-3469.
- HAMMOUD, S.S. [et al.] (2010). «Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility». *Fertility and Sterility*, vol. 94, núm. 5, p. 1728-33.
- JODAR, M. [et al.] (2012). «Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients.» *Human Reproduction*, vol. 27, núm. 5, p. 1431-1438
- MORINIÈRE, J. [et al.] (2009). «Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain». *Nature*, vol. 461, núm. 7264, p. 664–668.
- OLIVA, R. [et al.] (1990). «Histone hyperacetylation can induce unfolding of the nucleosome core particle». *Nucleic Acids Research*, vol. 18, núm. 9, p. 2739-2747.
- OLIVA, R. (2006). «Protamines and male infertility». *Hum. Reprod. Update*, vol. 12, núm. 4, p. 417-435.
- OLIVA, R.; Castillo, J. (2011). «Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation». *Asian Journal of Andrology*, vol. 13, núm. 1, p. 24-30.
- SABARI, B.R. [et al.] (2017). «Metabolic regulation of gene expression through histone acylations». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 18, p. 90–101.
- SOLER-VENTURA, A. [et al.] (2018). «Mammalian Sperm Protamine Extraction and Analysis: A Step-By-Step Detailed Protocol and Brief Review of Protamine Alterations». *Protein & Peptide Letters*, vol. 25, núm. 5, p.424-423.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010). «Examination and processing of human semen [Internet]». WHO Lab Man Exam Process Hum Semen Available from: http://whqli-bdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf.