

POSIBLE PAPEL DE H4K5bu EN LA TRANSICIÓN NUCLEOHISTONA-NUCLEOPROTAMINA DE LA ESPERMATOGÉNESIS HUMANA Y SU DESREGULACIÓN EN DIFERENTES PATOLOGÍAS TESTICULARES

Alberto de la Iglesia^{1*}, Ferran Barrachina^{1*}, Afsaneh Goudarzi², Sophie Rousseaux², Saadi Khochbin², Carme Mallofré³, Leonardo Rodriguez-Carunchio³, Josep Lluís Ballescà⁴, Rafael Oliva¹

¹Grupo 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, y Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, España (roliva@ub.edu)

²CNRS UMR 5309; Inserm, U1209; Université Grenoble Alpes; Institute for Advanced Biosciences, Grenoble, F-38700 Francia

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

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

*Equal contribution

Resumen

El reciente descubrimiento de nuevos tipos de acilaciones, concretamente la butirilación de lisinas (Kbu), como modificaciones postraduccionales (MPTs) de histona durante el proceso de gametogénesis masculina ha ampliado el campo de la regulación epigenética de la expresión génica durante la espermatogénesis. Kbu estimula la transcripción y compite directamente con la acetilación de lisinas (Kac), siendo ésta especialmente importante en el residuo Lisina 5 de la histona H4 (H4K5), en el que comienza la transición nucleohistona-nucleoprotamina dependiente de acetilación. Dada la importancia de la Kbu en la remodelación de la cromatina durante la espermatogénesis, el objetivo de nuestro estudio es caracterizar por primera vez el patrón de H4K5bu durante los diferentes estadios del proceso espermatogénico en humanos, así como analizar su desregulación en diferentes tipos de patologías testiculares. Para ello, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica (IHC) e inmunofluorescencia (IF) en biopsias testiculares humanas y espermatozoide maduro, respectivamente. La IHC reveló altos niveles de H4K5bu durante los estadios correspondientes a la transición de espermátida redonda a elongada en pacientes con espermatogénesis normal, un comportamiento similar al observado previamente para H4K5ac en ratón. Esta observación apoya la hipótesis de que, en humano, al igual que se ha visto en ratón, un mecanismo de competencia entre H4K5ac-H4K5bu lideraría el control de la transición histona a protamina en las células germinales masculinas. Además, la IHC de pacientes con arresto espermatogénico y cáncer testicular evidencia diferentes desregulaciones del patrón descrito, sugiriendo que H4K5bu podría estar involucrada en el correcto desarrollo de la espermatogénesis. En resumen, nuestros hallazgos contribuyen a una mayor comprensión de esta acilación durante la espermatogénesis humana, lo que apoyaría un nuevo mecanismo de remodelación de la cromatina necesario para el proceso de transición histona-protamina.

Paraules clau: butirilación de histona H4K5, H4K5bu, transición NH-NP, inmunohistoquímica, espermatogénesis.

Abstract

The recent finding of acylation histone post-translational modifications (PTMs) other than the well-known lysine acetylation (Kac) during the male gametogenic process, such as lysine butyrylation (Kbu), has broadened the field of epigenetic regulation of gene expression during spermatogenesis. Kbu stimulates transcription and is known to directly compete with Kac, being specifically relevant in Lys5 residues of histone H4 (H4K5), in which the acetylation-dependent nucleohistone to nucleoprotamine transition is triggered. Given the importance of Kbu in chromatin remodeling throughout spermatogenesis, the aim of our study is to characterize for the first time the pattern of H4K5bu during the different stages of the human spermatogenic process and to analyze its deregulation in different testicular pathologies. To address this issue, immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) assays were performed in human testicular biopsies and sperm cells, respectively. IHC results in normal spermatogenesis revealed high levels of H4K5bu during the stages corresponding to the transition from round to elongating spermatids, a similar behavior than H4K5ac (previously described in mouse). This observation supports the hypothesis that, as previously shown in mouse, a dynamic H4K5bu-H4K5ac competing mechanism would be leading the control of histone-to-protamine transition in

human male gametogenic cells. Furthermore, IHC in patients with spermatogenic arrest or testicular cancer evidences different deregulations of the described pattern, suggesting that H4K5bu could be involved in the correct development of spermatogenesis. In summary, our findings contribute to nourish the knowledge of this non-acetyl acylation during human spermatogenesis supporting a novel competing mechanism of chromatin remodeling required for the histone-to-protamine transition process.

Key words: histone H4K5 butyrylation, H4K5bu, NH-to-NP transition, immunohistochemistry, spermatogenesis.

INTRODUCCIÓN

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación celular complejo y altamente regulado que permite que las células madre germinales masculinas diploides se transformen en células haploides altamente especializadas, los espermatozoides. Durante la última etapa de éste proceso, la espermiogénesis, se producen los cambios más dramáticos a nivel morfológico, citoplasmático y nuclear. Uno de los procesos clave a nivel de la cromatina es la transición de nucleohistona a nucleoprotamina, que da lugar a un núcleo altamente compactado, necesario para proteger el genoma paterno del ataque de nucleasas y conferir al espermatozoide de una estructura hidrodinámica necesaria para su función (Oliva y Mezquita, 1982; Oliva *et al.*, 1987; Oliva *et al.*, 1990; Oliva y Dixon, 1991; Oliva, 2006; Oliva y Castillo, 2011; Neto *et al.*, 2016). No obstante, este reemplazamiento no es completo y, mientras un 85-95% del DNA queda unido a la fracción nucleoprotamina en una estructura toroidal muy compacta, el 5-15% restante permanece unido a una fracción nucleohistona residual (Gatewood *et al.*, 1987; Oliva, 2006; Balhorn, 2007; Rathke *et al.*, 2014). Este proceso está altamente regulado a nivel epigenético interviniendo de forma clave las modificaciones postraduccionales (MPTs) de las histonas (Rathke *et al.*, 2014). Concretamente, una ola de hiperacetilación de las histonas es el detonante que desencadena el proceso de reemplazamiento de histonas en el núcleo del espermatozoide (Oliva y Mezquita, 1982; Oliva *et al.*, 1990; Goudarzi *et al.*, 2014). Cuando las histonas son hiperacetiladas, el primer bromodominio de la proteína Brdt (*bromodomain testis-specific protein*) reconoce el residuo de lisina 5 de la histona H4 (H4K5) (Morinière *et al.*, 2009) y empieza la transición: primero, las histonas son reemplazadas por variantes de histonas y, posteriormente, por proteínas de transición, que serán finalmente sustituidas por protaminas (Kimmins y Sassone-Corsi, 2005; Oliva 2006; Balhorn, 2007; Rathke *et al.*, 2014; Bao y Bedford, 2016; Oliva and Castillo, 2011). Sin embargo, hallazgos recientes sugieren la posible implicación de nuevos participantes en este proceso, así como de nuevas funciones de elementos ya conocidos. Por ejemplo, la participación de la variante H2A.L.2 de la histona H2A parece ser indis-

pensable para la unión de las proteínas de transición, las cuales, en contra de lo que se pensaba, no reemplazan directamente las histonas sino más bien parece que son cruciales para el reclutamiento de las protaminas y su correcto procesamiento, siendo las protaminas las verdaderas mediadoras del reemplazo de histonas (Barral *et al.*, 2017). Por otro lado, parece ser que no sólo las acetilaciones de las histonas regulan epigenéticamente este proceso, sino que también intervendrían otras MPTs, todas pertenecientes al grupo de las acilaciones (Sabari *et al.*, 2017). Entre ellas, se ha descrito un papel clave de la butirilación en la espermatogénesis de ratón, compitiendo por la acetilación en H4K5 durante el proceso de recambio de histona a protamina (Goudarzi *et al.*, 2016) (Figura 1). Se ha descrito que cuando H4K5 es butirilada (H4K5bu) en vez de acetilada (H4K5ac), el primer bromodominio de Brdt no puede reconocer dicho residuo, evitando así el reemplazamiento de las histonas dependiente de hiperacetilación. Es por ello que se ha propuesto que las histonas H4K5bu serían reemplazadas de una forma más tardía en comparación con las histonas H4K5ac, sin coincidir temporalmente con las proteínas de transición. Este hecho sugiere que el intercambio de H4K5bu se produciría directamente por protaminas, dando una conformación toroidal final menos compacta. La hipótesis de nuestro trabajo es que este mecanismo de competencia H4K5ac-H4K5bu podría estar presente también en humanos. Por tanto, nuestro primer objetivo será caracterizar por primera vez el patrón de H4K5bu durante la espermatogénesis humana, así como analizar su desregulación en diferentes tipos de patologías testiculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Biopsias testiculares y muestras de semen

Las biopsias testiculares provienen del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic (Barcelona, España). Se definieron dos grupos de estudio principales: (i) pacientes con espermatogénesis normal (n=5) y (ii) pacientes con espermatogénesis alterada, dentro del cual se incluyen pacientes con Síndrome de *Sertoli cell-only* (n=3), hipoespermatogénesis (n=3), arresto espermato-

génico (n=4), seminoma (n=3) y teratoma (n=1). Las muestras de semen humano provienen de pacientes de la clínica de fertilidad del Hospital Clínic de Barcelona (FIV Clinic). Todos los pacientes han dado el consentimiento informado para participar en el estudio.

ros estadios de espermátidas redondas (Estadios I-V) (ii) Estadios tardíos de espermátidas redondas (Estadios VI-VIII), (iii) Espermátida elongada (Estadios IX-XII) y (iv) Espermátidas condensantes.

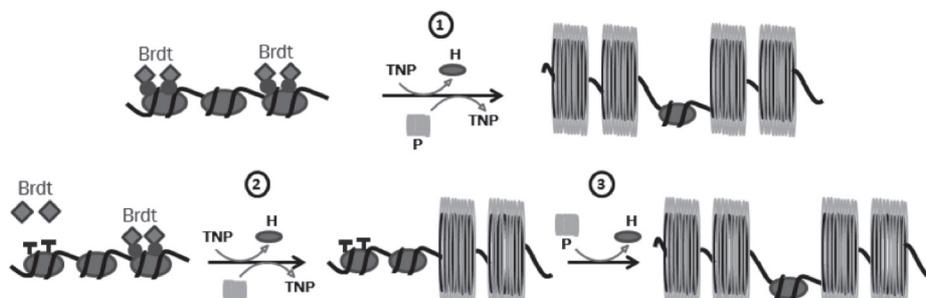


Figura 1. Mecanismo de actuación propuesto para H4K5bu en la transición nucleohistona-nucleoprotamina por Goudarzi *et al.*, 2016. Cuando Brdt (*Bromodomain testis-specific protein*) reconoce el residuo H4K5ac (círculo en la imagen) en el nucleosoma, se desencadena la transición nucleohistona a nucleoprotamina (1), y las histonas (H) son sustituidas por proteínas de transición (TNP) y éstas después por protaminas (P) (parte de arriba). Sin embargo, el bromodominio de Brdt no reconoce a H4K5bu (forma de T en la imagen), por lo que H4K5bu evitaría el recambio de histonas dependiente de acetilación (2). En lugar de esto, las histonas butiriladas llevarían a cabo un recambio tardío directamente por protaminas, sin la intervención de proteínas de transición (3).

Inmunohistoquímica (IHC)

Las biopsias testiculares fueron fijadas por inmersión en fijador *Bouin* y embebidas en parafina. La IHC se realizó siguiendo las especificaciones de Minjia *et al.*, 2011. Se incubó con anticuerpo anti-H4K5bu a concentración 1:400 en leche 1%-PBS (PTM-313; PTM Biolabs). La incubación con anticuerpo secundario biotinilado en dilución 1:200 en leche 0,5%-PBS (B7264; Vector Laboratories) se realizó durante 30 min a temperatura ambiente. Se llevó a cabo una contracoloración PAS-hematoxilina. Las secciones se observaron en microscopio óptico (Olympus BX50).

Clasificación de los estadios de la espermatogénesis humana

La clasificación de los estadios de la espermatogénesis en los túbulos seminíferos se realizó siguiendo la nueva clasificación definida por Muciaccia *et al.*, 2013. Se analizaron un total de 30 túbulos de cada muestra para la caracterización del patrón de H4K5bu. El criterio de inclusión se acotó a la identificación de todos los tipos celulares esperados para cada uno de los estadios y a una correcta distribución de los diferentes tipos celulares dentro del túbulo seminífero. Para la comparación entre diferentes grupos, se agruparon las espermátidas analizadas en diferentes rangos de estadios: (i) Prime-

Inmunofluorescencia (IF)

Tras la descondensación de los núcleos de espermatozoides, el protocolo de IF se realizó según se describe en Ramalho-Santos *et al.*, 2007. El anticuerpo anti-H4K5bu ya mencionado se aplicó a concentración 1:200 durante 16h a 4°C. El anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit (dilución 1:500 en PBS + 5% leche desnatada + 0.2% Tween 20) se aplicó durante 30 min a 37°C. Se observó en microscopio de fluorescencia (Olympus BX50).

RESULTADOS

H4K5bu se detecta durante la transición de espermátida redonda a elongada en la espermatogénesis humana normal

La IHC de H4K5bu durante la espermatogénesis humana normal permitió caracterizar su presencia en los diferentes tipos de células germinales, así como en las células somáticas de Sertoli (Figura 2). Se determinó el porcentaje de detección de H4K5bu expresado en función del número de túbulos positivos con respecto al total de túbulos identificados para un estadio determinado, así como la intensidad de la tinción. Las células de Sertoli presentaron unos niveles basales de butirilación,

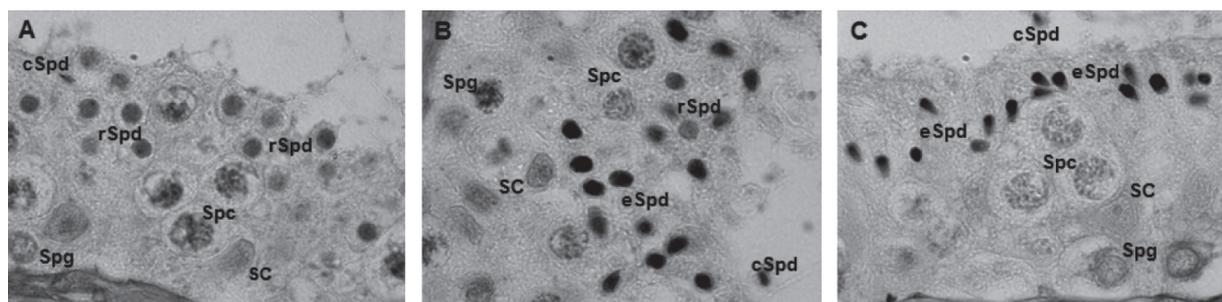


Figura 2. Detección mediante IHC de H4K5bu en túbulos seminíferos de testículo durante los estadios II/III (A), VIII/IX (B) y X (C) de la espermatogénesis humana. Los diferentes tipos celulares de la espermatogénesis se muestran en las imágenes como Spg (espermatogonia), Spc (espermatocito), rSpd (espermátida redonda), eSpd (espermátida elongada) y cSpd (espermátida condensante). Las células de Sertoli se indican como SC.

evidenciados por los bajos porcentajes de detección e intensidad de la misma (Tabla 1). Respecto a los diferentes tipos de células germinales, el cribado inicial mostró una mayor detección de esta MPT desde los últimos estadios de espermátida redonda hasta alcanzar su pico máximo en los estadios de espermátida elongada, para después disminuir drásticamente en las espermátidas condensantes (Tabla 1). Esto nos llevó a profundizar más en el estudio de H4K5bu en las diferentes fases de espermátidas (Figura 3). En base a la clasificación de los diferentes estadios de la espermatogénesis establecida por Mucciaccia *et al.*, 2013, se observaron los mayores niveles de detección e intensidad de H4K5bu concretamente en espermátidas VIII-XI, coincidiendo con la transición de espermátida redonda a

elongada (Figura 3). Por otro lado, las espermatogonias y los primeros estadios de espermátida redonda mostraron unos bajos niveles de butirilación (Tabla 1).

El patrón de H4K5bu se encuentra desregulado principalmente en pacientes con arresto espermatogénico y cáncer testicular

Para esclarecer el papel de H4K5bu en la espermatogénesis humana, una vez caracterizado el patrón normal de H4K5bu estudiamos posibles desregulaciones del mismo en pacientes con diferentes tipos de patologías testiculares. Todos los grupos de pacientes estudiados presentaron cambios en el patrón de H4K5bu comparados con el grupo control (espermatogénesis normal)

Tabla 1. Resultados de IHC de H4K5bu para los diferentes grupos de estudio, referidos a cada tipo celular estudiado. Los resultados vienen expresados por el porcentaje de túbulos que presentaron tinción de H4K5bu para cada tipo celular estudiado con respecto al total de túbulos estudiados (superíndice), así como por la intensidad de la tinción en una escala arbitraria con rango de 1 a 6 (\pm : 0-1.5; +: 1.5-2.5; ++: 2.5-3.5; +++: 3.5-4.5; ++++: 4.5-6; NA: no detectado).

Grupo	SC	SPG	SPC	rSPD (I-V)	rSPD (VI-VIII)	eSPD	cSPD
NORMAL (n=5)	1% ¹⁴⁸ (+)	15% ¹⁵⁴ (++)	0% ¹⁵⁹	15% ⁵³ (+)	70% ⁵¹ (++++)	95% ¹⁰⁵ (++++)	1% ⁷⁶ (\pm)
SERTOLI-CELL ONLY (n=3)	10% ⁹⁰ (\pm)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HIPOESPERMATOGÉNESIS (n=3)	0% ⁷¹	30% ⁶⁷ (+)	0% ⁷²	25% ¹⁹ (-)	80% ¹⁴ (++++)	95% ³⁷ (++++)	25% ¹³ (\pm)
ARRESTO ESPERMATOGÉNICO (n=4)	0% ¹⁰⁰	7% ¹¹² (\pm)	1% ⁹⁷ (\pm)	50% ²⁷ (++)	60% ⁸ (++++)	95% ³² (++++)	40% ¹⁰ (++)
SEMINOMA (n=3)	0% ⁸⁰	25% ⁸² (\pm)	0% ⁸⁰	0% ²⁵	65% ¹⁷ (++)	75% ⁵⁹ (+++)	0% ¹⁹
TERATOMA (n=1)	10% ²⁸ (\pm)	65% ²⁷ (\pm)	0% ³⁰	40% ¹⁰ (+)	100% ⁴ (+++)	100% ²¹ (++++)	0% ⁸

SC: células de Sertoli; SPG: espermatogonias; SPC: espermatocitos; rSPD: espermátidas redondas; eSPD: espermátidas elongadas; cSPD: espermátidas condensantes.

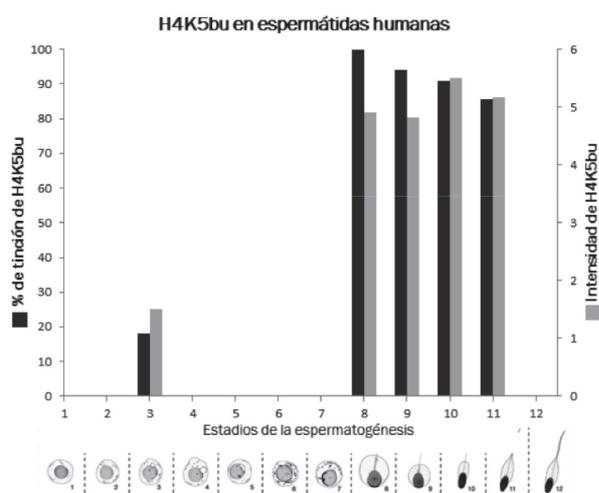


Figura 3. Resultados de IHC para H4K5bu en espermátidas humanas según los distintos estadios de la espermatogénesis (modificado de Muciaccia *et al.*, 2013). Los resultados vienen expresados por el porcentaje de túbulos que presentaron tinción de H4K5bu para cada tipo celular estudiado con respecto al total de túbulos estudiados y por la intensidad de la tinción en una escala con rango de 1 a 6.

(Tabla 1). Entre ellos, cabe destacar los cambios encontrados a nivel de espermátida en los grupos de arresto espermatogénico y de cáncer testicular. Los pacientes con arresto espermatogénico presentaron mayores niveles de H4K5bu en los primeros estadios de espermátida redonda en comparación con el patrón normal, tanto en el porcentaje de detección como en la intensidad de la misma (Tabla 1).

Por otro lado, los pacientes con diferentes tipos de cáncer testicular presentaron dos comportamientos opuestos con respecto al patrón normal de H4K5bu en las espermátidas redondas y elongadas: (i) los pacientes con seminoma presentaban un porcentaje de detección, así como una intensidad de H4K5bu menores que el grupo control, mientras que (ii) el paciente con teratoma presentó unos niveles de detección e intensidad superiores al grupo control (Tabla 1).

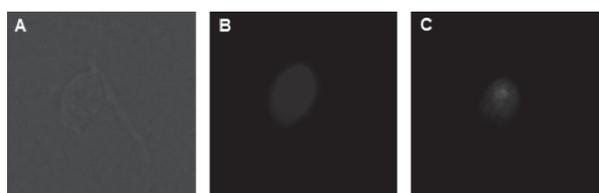


Figura 4. H4K5bu se detectó mediante IF en el núcleo de espermatozoides maduros. (A) Visualización en microscopía de campo claro, (B) Tinción de DNA con DAPI y (C) Inmunodetección de H4K5bu.

H4K5bu está presente en espermatozoide maduro

Los estudios de IF en espermatozoide maduro evidenciaron que, a pesar de la disminución de detección de H4K5bu en espermátidas condensantes, un remanente de H4K5bu permanece asociado a la cromatina del espermatozoide maduro de pacientes con seminograma normal (Figura 4).

DISCUSIÓN

En este estudio se define por primera vez el patrón que sigue H4K5bu durante la espermatogénesis humana normal y su presencia en el espermatozoide maduro, así como cambios del mismo en pacientes con diferentes patologías testiculares. La presencia de altos niveles de H4K5bu, específicamente en los últimos estadios de espermátida redonda y durante espermátida elongada, coincide temporalmente con la transición nucleohistona-nucleoprotamina que ocurre durante la espermiogénesis, sugiriendo la participación de esta MPT en los mecanismos reguladores de dicho proceso. Además, los niveles superiores de H4K5bu en espermátidas redondas encontrados en los pacientes con arresto espermatogénico nos llevan a pensar que, cambios en el patrón de expresión de esta modificación en estadios previos a la transición nucleohistona-nucleoprotamina podrían estar provocando una incorrecta regulación global de dicho proceso. Así mismo, los pacientes de cáncer testicular (seminoma y teratoma) posiblemente con una desregulación general de diferentes mecanismos epigenéticos, presentan también una desregulación del patrón de H4K5bu en los túbulos seminíferos que no están directamente afectados por las células cancerosas.

Los resultados de este estudio apoyan resultados previos obtenidos en ratón por Goudarzi *et al.*, 2016, que sugieren la competencia de H4K5ac-H4K5bu en el control de la unión del primer bromodominio de Brdt en la reorganización diferencial de la cromatina espermática. Este mecanismo sería crucial en el intercambio histona-protamina, siendo las histonas butiriladas aquellas que se eliminarían de una forma más tardía y que sufrirían una sustitución directa por protaminas sin la ayuda de proteínas de transición, resultando así en unas estructuras toroidales menos compactas que aquellas que siguen el patrón normal de reemplazamiento. Nuestros resultados para el patrón H4K5bu en espermatogénesis humana apuntan a que dicho mecanismo competitivo podría existir también en modelos de espermatogénesis de mamíferos superiores, por lo que actualmente estamos llevando a cabo estudios de H4K5ac en los mismos pacientes estudiados en el presente estudio.

Por último, la identificación de H4K5bu en el espermatozoide maduro podría ser resultado de remanentes de la espermatogénesis sin una función específica. Sin embargo, no se descarta que pueda representar una marca epigenética potencialmente involucrada en la regulación de la transcripción durante las primeras fases del desarrollo embrionario. Futuros estudios que exploren qué regiones del DNA de espermatozoide están asociadas a H4K5bu mediante Chip-seq podrían aclarar el posible papel de esta MPT en la embriogénesis temprana.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que, al igual que en ratones, el marcaje diferencial de la histona H4 con diferentes grados de acilación podría ser clave en la regulación epigenética de la remodelación cromatínica del espermatozoide e incluso podría participar en los primeros momentos del desarrollo del embrión.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se encuentra subvencionado a cargo del proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad, Fondos FEDER, ISCIII (PI16/00346, PI13/00699), Fundación Salud 2000 (SERONO 13-015) y EUGENUB (EU-REP 2014), a R.O. F.B. está subvencionado por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte para la Formación de Profesorado Universitario (FPU15).

REFERENCIAS

- Balhorn, R. (2007). «The protamine family of sperm nuclear proteins». *Genome Biol.*, 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.
- Barral, S. [et al.] (2017). «Histone Variant H2A.L.2 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells». *Molec. Cell*, vol. 66, núm. 1, p. 89-101.
- Gatewood, J.M. [et al.] (1987). «Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin». *Science*, vol. 236, núm. 4804, p. 962–964.
- Goudarzi, A. [et al.] (2014). «Genome-scale acetylation-dependent histone eviction during spermatogenesis». *J. Mol. Biol.*, 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». *Molec. Cell*, vol. 62, núm. 2, p. 169-180.
- Kimmins, S., Sassone-Corsi, P. (2005). «Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells». *Nature*, vol. 434, núm. 7033, p. 583–589.
- Minjia, T. [et al.] (2011). «Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification». *Cell*, vol. 146, núm. 6, p. 1016-1028.
- 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.
- Muciaccia, B. [et al.] (2013). «Novel Stage Classification of Human Spermatogenesis Based on Acrosome Development». *Biol. of Reprod.*, vol. 89, núm. 3, p. 1-10.
- Neto, F.T.L. [et al.] (2016). «Spermatogenesis in humans and its affecting factors». *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 59, p. 10-26.
- Oliva, R.; Mezquita, C. (1982). «Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids». *Nucleic acids research*, vol. 10, núm. 24, p. 8049-8059.
- Oliva, R., [et al.] (1987). «Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, núm. 35, p. 17016-17025.
- 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.; Dixon, G.H. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction». *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, vol. 40, p. 25-94.
- 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.
- Ramalho-Santos, J. [et al.] (2007). «Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy». *Mod. Res. Educ. Top. Microsc.*, vol. 1, p. 394–402.
- Rathke, C. [et al.] (2014). «Chromatin dynamics during spermiogenesis». *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, vol. 1839, núm. 3, p. 155–168.
- Sabari, B.R. [et al.] (2017). «Metabolic regulation of gene expression through histone acylations». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 18, p. 90–101.