

Estudio mutacional del gen *HSPA2* en pacientes estériles y en controles

Rubén Azpiazu^a, Meritxell Jodar^a, Sara de Mateo^a, Josep Oriola^a, José Luis Ballecà^b y Rafael Oliva^a

^aGrupo de Genética Humana. Unidad de Genética. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. IDIBAPS. Barcelona. España. Servicio de Bioquímica y Genética Molecular. Hospital Clínico y Provincial. Barcelona. España.

^bInstitut Clínic de Ginecologia, Obstetricia i Neonatologia. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona. España.

RESUMEN

Objetivos: En el presente trabajo nos propusimos realizar un estudio mutacional en el gen *HSPA2* en diversos tipos de pacientes estériles. La justificación del estudio se basa en los resultados de diversos estudios previos que sugieren que el gen *HSPA2* es un gen candidato que podría explicar algunos de los casos de esterilidad.

Métodos: Se incluyó un total de 29 pacientes, de los cuales 16 presentaban una azoospermia con parada madurativa, 6 con oligoastenoteratozoospermia severa y 7 pacientes teratozoospermia. Incluimos también 4 controles con fertilidad probada. Metodológicamente se diseñaron nuevos oligonucleótidos y se estandarizaron las condiciones para la amplificación específica del gen *HSPA2* mediante PCR y su secuenciación.

Resultados: No se ha detectado ninguna mutación que pueda ser considerada patogénica en las muestras analizadas. Se han detectado 3 polimorfismos tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*) de los que uno de ellos no se ha descrito previamente (*HSPA2* c.1443 C>T) y se observa en heterocigosis en un paciente azoospermico y en un paciente oligoastenoteratozoospermico. La frecuencia alélica del alelo 684 T resultó estar incrementada dentro del grupo de pacientes azoospermicos (0,687) en comparación con la presente en el resto de pacientes (0,308; $p < 0,005$).

Discusión: Los resultados de este estudio sugieren que la presencia de mutaciones patogénicas en el gen *HSPA2*, en caso de que existan, debe de ser una causa relativamente infrecuente de infertilidad en pacientes estériles. De los polimorfismos detectados el cambio 684 C>T está presente con una frecuencia alélica significativamente incrementada en pacientes azoospermicos, lo cual sugiere que este polimorfismo se puede comportar como un factor de riesgo de azoospermia. Queda ahora abierta la posibilidad de confirmar este hallazgo en estudios subsiguientes utilizando los oligonucleótidos y condiciones descritos en un grupo más grande de pacientes y de controles.

Palabras clave: *HSPA2*. Azoospermia. Oligoastenoteratozoospermia. Teratozoospermia. Polimorfismo. Mutación. Esterilidad.

ABSTRACT

Mutational study of the *HSPA2* gene in infertile patients and controls

Objectives: We started the present work to perform a mutational study on the *HSPA2* gene in different types of infertile patients. The rationale for this work is based on the results of previous studies which suggest that the *HSPA2* gene may be a candidate gene to explain some of the cases of infertility.

Methods: We included a total of 29 patients of whom 16 were azoospermic, 6 severe oligoasthenoteratozoospermic, and 7 teratozoospermic. Also 4 fertility proven controls were included. Different oligonucleotides were designed and the conditions were standardized to obtain a specific gene amplification of the *HSPA2* gene using PCR. The amplification products were sequenced directly and analysed using an automatic sequencer.

Results: No pathogenic mutations were detected in the samples analyzed. However, three SNPs (single nucleotide polymorphisms) were detected of which one of them had not been previously described (*HSPA2* c.1443 C>T) and was observed in an azoospermic patient and in one oligoasthenoteratozoospermic patient. The allelic frequency of the 684 T allele was found to be increased within the group of azoospermic patients (0.687) as compared to that present in the rest of the patients (0.308; $P < .005$).

Discussion: The results from the present study suggest that the presence of pathogenic mutations in the *HSPA2* gene, if any, should be a relatively uncommon cause of infertility in infertile patients. Of the polymorphisms detected, the change 684 C>T has been detected at a significantly increased allelic frequency, suggesting that this polymorphism may be as a risk factor for azoospermia. The possibility is now open to confirm these findings in subsequent studies using the oligonucleotides and conditions described in a larger group of patients and controls.

Key words: *HSPA2*. Azoospermia. Oligoasthenoteratozoospermia. Teratozoospermia. Polymorphism. Mutation. Infertility.

Correspondencia: Dr. R. Oliva.

Grupo de Genética Humana. Unidad de Genética.

Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona.

Casanova, 143. 08036 Barcelona. España.

Correo electrónico: roliva@ub.edu

INTRODUCCIÓN

El gen *HSPA2* codifica para la proteína de HSPA2 (Heat Shock Protein A2) y presenta un único exón de 1.920 pb¹. Perteneció a la familia de proteínas de choque térmico (HSP) que son chaperonas moleculares que asisten a otras proteínas en su plegado y transporte. La proteína HSPA2 o HSPA70.2 es un tipo específico de HSP ubicado en la especie humana locus 14q24.1 y que se expresa especialmente en las células espermatogénicas². Se han descrito diversas funciones en la espermatogénesis. Son esenciales para el proceso meiótico, se asocian al complejo sinaptonémico y se relacionan con la inhibición apoptótica³. También tienen un papel importante en la espermiogénesis durante la transición núcleo-histona núcleo-protamina en las espermátidas alongadas². En general participan en la maduración del espermatozoide^{3,4}. De relevancia se ha descrito que los ratones *knock-out* para *HSPA2* presentan una parada madurativa en el estadio de espermátocitos primarios y son estériles⁵.

Adicionalmente, en estudios previos en nuestro grupo detectamos la proteína HSPA2 a través de técnicas proteómicas⁶. Subsiguientemente se detectó evidencia de un incremento de la HSPA2 en pacientes estériles con un incremento de lesión germinal determinada por TUNEL⁷. Más recientemente hemos podido demostrar la presencia de valores incrementados de HSPA2 en pacientes astenozoospermicos⁸. También de relevancia, y utilizando el cerdo como modelo, se ha descrito una asociación del gen *HSPA2* con la calidad espermática^{9,10}. Todas estas razones sugerían la posibilidad de que variantes del gen *HSPA2* en la especie humana pudiesen estar relacionadas con algunos casos de esterilidad. Por tanto iniciamos el presente trabajo con los objetivos de analizar en más detalle la relación entre incremento de HSPA2 y lesión germinal y de realizar un estudio mutacional del gen *HSPA2* en pacientes varones estériles.

MÉTODOS

Sujetos y recogida de muestras

Las muestras de los pacientes estériles provienen del Laboratorio de Andrología y del Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. El comité de bioética del hospital aprobó este proyecto y se obtuvo consentimiento informado de los participantes. Las muestras de semen fueron recogidas por masturbación en envases estériles después de al menos 3 días de abstinencia sexual, pero no más de 7 días. Las muestras se mantuvieron entre 22 y

37 °C de temperatura y fueron evaluadas en el laboratorio dentro de 1 h desde su recogida. Posteriormente, la muestra sobrante que normalmente se desecha fue procesada para su análisis proteómico y de fragmentación del ADN, o para proceder al aislamiento de ADN.

Análisis proteómico de la HSPA2

Se incluyeron un total de 25 muestras de semen de 25 pacientes para el análisis proteómico de la proteína HSPA2. El plasma seminal se eliminó mediante gradiente de Percoll al 50%¹¹. Los espermatozoides se resuspendieron en ham F10 1× y se lavaron 2 veces con el mismo medio. Se calculó un volumen de *buffer* de lisis para obtener una concentración de 230 millones de espermatozoides/ml en un volumen de 300 µl por cada tira de isoelectroenfoque (IEF). Las muestras se incubaron 1 h a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3.000 g 5 min a 4 °C. Seguidamente se procedió a realizar el IEF y la electroforesis. Las proteínas solubilizadas se colocaron en la bandeja de rehidratación con tiras de 17 cm (pH: 5-8) lineales y rehidratadas durante 12 h. El IEF se realizó a 20 °C 15 min (0-250 V), 2 h (250-10.000 V), 45.000-60.000 V/h (10.000 V) y 10 h (50 V). Una vez terminado el IEF, las tiras se equilibraron en 6 M urea, 0,375 M tris-HCl, pH 8,8, 20% glicerol, SDS 2% y 2% DTT 10 min, seguido por el mismo tampón sin DTT y suplementado con 2,5% iodoacetamida durante 10 min. La segunda dimensión por electroforesis se realizó con una protean II a 300 V durante 3 h^{7,12}. Finalmente se procedió a teñir los geles 2D con pink flamingo y se escanearon con typhoon SG-800. Las imágenes se procesaron con el *software* PDQuest 7.1.1., y la proteína HSPA2 se identificó por su movilidad relativa (basada en el punto isoelectro y peso molecular) en comparación con geles previos con las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas^{6-8,12}. La cuantificación de la intensidad de la proteína HSPA2 correspondiente a los 25 bidimensionales (1 de cada paciente) se realizó también con el *software* PDQuest 7.1.1.

Ensayo de TUNEL

Una alícuota de semen correspondiente a cada una de las 25 muestras procesadas para proteómica también fue procesada para su análisis mediante TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*) a través de microscopia óptica empleando el kit de detección de muerte celular in situ de Roche y un microscopio Olympus DX-50. Los datos fueron recogidos y procesados usando el *software* CELLQUEST y WinMDI v2.8¹³.

Aislamiento del ADN

Para aislar el ADN correspondiente a los 7 pacientes teratozoospermicos incluidos en el estudio, se partió de una alícuota de la muestra de semen y se utilizó el método de tiocianato de guanidina modificado^{14,15}. Brevemente se procesaron 5 millones de espermatozoides que se trataron con 1 ml de tampón de lisis (6 M tiocianato de guanidina; 30 mM citrato sódico a pH 7; 0,5% sarcosil; 0,20 mg/ml proteinasa K; 0,3 M β -mercaptoetanol) durante 4 h a 55 °C. A continuación se añadió el doble de volumen de alcohol isopropílico para precipitar el ADN. Subsiguientemente se realizaron 2 lavados con etanol 70% para eliminar las sales y, finalmente, disolviendo el ADN en TE (tris 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM) procediendo finalmente a la lectura de su concentración mediante el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000¹⁵. Para aislar el ADN correspondiente a los pacientes azoospermicos, oligoastenoteratozoospermicos y de los controles con fertilidad probada se partió de muestras de sangre periférica. El aislamiento de ADN se realizó mediante el kit QIAamp DNA Mini de Qiagen según su protocolo. Una vez obtenido el ADN se realizó su lectura mediante el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. Para proceder al estudio de mutaciones se utilizó el sobrante de ADN después de proceder a los estudios de microdeleciones del cromosoma Y practicados a los pacientes azoospermicos o oligoastenoteratozoospermicos (ninguno de estos pacientes presentaba una microdelección del cromosoma Y).

Amplificación y secuenciación del gen *HSPA2*

Previamente se diseñaron oligonucleótidos específicos con el programa Primer3 para conseguir amplificar y secuenciar de forma específica el gen *HSPA2* (fig. 1), discriminándolo de pseudogenes y genes homólogos pertenecientes a la familia de la HSP. La secuencia de los oligonucleótidos diseñados (fig. 1A) es F1 (5'-GTGGAGCTGGAAGAGTTTGTGAG-3'), R1 (5'-CCACTCATCAAGAGGAACACCAC-3'), F2 (5'-GAACGTGCTCATCTTTGACCTG-3'), R2 (5'-CACACCTGTTCTGTAGAAGCTTG-3'). Los reactivos incluidos en la reacción de amplificación fueron los siguientes: 1 μ l de ADN; 1,25 μ l de cada pareja de oligonucleótidos (20 pmol/ μ l); 0,5 μ l de DMSO para evitar la formación de dímeros de oligonucleótidos; 1,5 μ l de Cl_2Mg , y 0,1 volumen de tampón de reacción 10 \times incluido en el kit de PCR (Biotherm DNA polimerasa) en un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de amplificación por PCR fueron las siguientes: 96 °C durante 5 min seguidos de 35 ciclos de 96 °C durante 1 min, temperatura de hibridación de los oli-

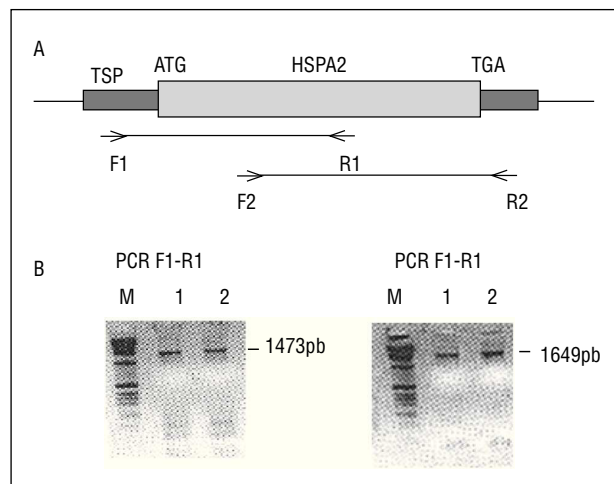


Figura 1. Estructura del gen de la *HSPA2* y oligonucleótidos utilizados para su amplificación por PCR. A) Se muestra la estructura del gen *HSPA2* y se indica la combinación de los oligonucleótidos utilizados. B) Resultado de la amplificación del gen *HSPA2*. El producto de amplificación correspondiente a las 2 combinaciones de oligonucleótidos se ha separado mediante electroforesis en gel de agarosa. Se aprecian las bandas correspondientes a los productos de amplificación del gen *HSPA2* esperados de 1.473 y 1.649 pares de bases, respectivamente.

gonucleótidos cebadores durante 30 s (F1-R1: 58 °C; F2-R2: 65 °C) y la extensión de bases a 72 °C (F1-R1: 4 min; F2-R2: 5 min). Una vez terminada la reacción de PCR se procedió a la comprobación del tamaño de los productos de amplificación obtenidos a través de su electroforesis en gel agarosa (fig. 2B).

Para proceder a su secuenciación se realizó un tratamiento previo con 2 μ l de exosap-IT por 5 μ l de producto de PCR para eliminar los oligonucleótidos y los nucleótidos sobrantes de la PCR. Se incubaron a 37 °C durante 20 min y a 80 °C durante 10 min. La reacción de secuenciación se realizó con el kit de secuenciación cíclica BigDye Terminator v3.1 siguiendo las instrucciones del kit comercial. Para acabar se precipita el producto de secuenciación, para lo cual se añaden 5 μ l de EDTA 125 mM y 60 μ l de etanol 100% a temperatura ambiente, se deja precipitar durante 20 min y se centrifuga a 12.000 rpm 15 min a 4 °C. Se descarta entonces el sobrenadante y se lava el sedimento con 50 μ l de etanol al 70% en frío. Finalmente se centrifuga a 12.000 rpm, 2 min a 4 °C, se descarta el sobrenadante y se seca el *pellet* a temperatura ambiente. Una vez precipitado el ANA ya está preparado para cargar en el secuenciador automático DNA 3100. Una vez obtenida la secuencia se procedió al análisis de la región codificante mediante los programas CHROMAS y DNASTAR.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico SPSS 14.0. La búsqueda de correlaciones entre los valores de *HSPA2* y los resultados de TUNEL se analizó mediante el test de Spearman. Las posibles asociaciones entre los polimorfismos identificados y los fenotipos se exploraron mediante el test de χ^2 . En todos los casos el valor aceptado de significación estadística fue de 0,05.

RESULTADOS

Correlación entre los niveles de *HSPA2* y resultados del ensayo de TUNEL

Se ha detectado una correlación positiva entre la intensidad del punto proteico de las bidimensionales correspondiente a la *HSPA2* (fig. 2A) y la fragmentación del ADN determinada por TUNEL en pacientes estériles ($p = 0,044$ –Mann-Whitney–). El detalle del diagrama de dispersión junto con la recta de regresión se muestran en la figura 2B⁷. A parte de la tendencia de correlación significativa indicada se aprecia también una elevada dispersión de los puntos, posiblemente debido a la existencia de diversos factores adicionales que afectan los valores de *HSPA2* y los resultados de TUNEL.

Estudio mutacional del gen *HSPA2*

El análisis de las secuencias en el gen *HSPA2* en las muestras estudiadas, no ha detectado ninguna mutación que resulte en un cambio del aminoácido o que provoque un truncamiento de la proteína o un cambio en la marca de lectura. Por tanto, no se ha encontrado ninguna mutación que pueda ser considerada patogénica. Se han detectado 3 polimorfismos (tipo SNP) que no comportan ningún cambio de aminoácido. Encontramos que 2 de los SNP ya se han descrito previamente (NCBI). Uno de estos SNP corresponde a la variante c.684 C>T (p.Asp228Asp) encontrada en heterocigosis en 10 pacientes azoospermicos con parada madurativa, en 4 oligoastenoteratozoospermicos, en 2 teratozoospermicos y en 2 controles. Esta variante fue observada en homocigosis en 6 pacientes azoospermicos con parada madurativa, en 1 paciente teratozoospermico y en 1 paciente control (tabla 1). El otro SNP ya descrito previamente corresponde a la variante c.1653 C>T (p.Asn551Asn) detectada en heterocigosis en un paciente con azoospermia y parada madurativa y en un paciente con oligoastenoteratozoospermia severa (tabla 1). También hemos encontra-

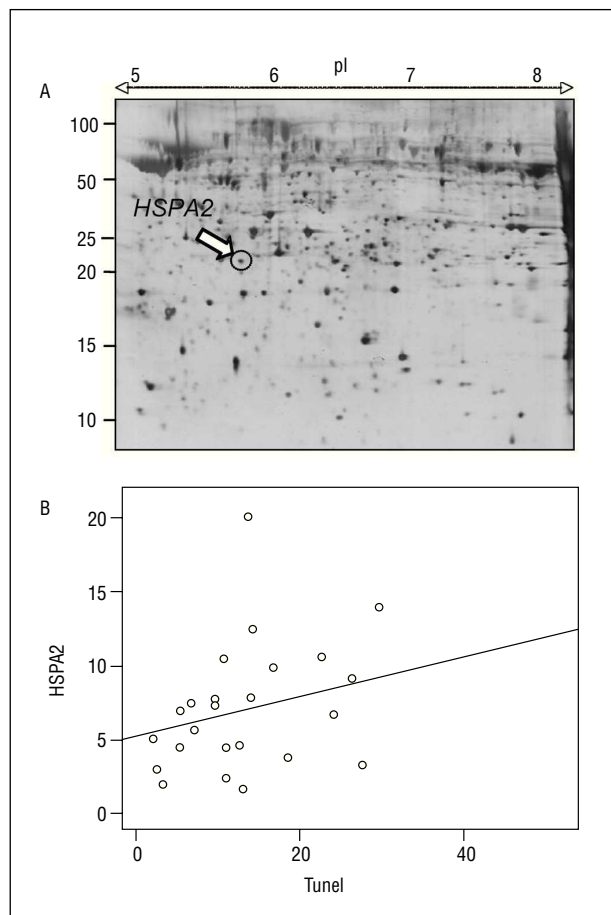


Figura 2. Correlación entre los valores de *HSPA2* y los resultados de TUNEL en pacientes estériles. A) Detección de la proteína *HSPA2* de espermatozoides mediante electroforesis bidimensional identificada previamente por nuestro grupo a través de espectrometría de masas. B) Gráfico de dispersión entre los resultados de expresión de la proteína *HSPA2* y la fragmentación del ADN determinada por TUNEL. Cada símbolo corresponde a un paciente independiente. Se detecta una correlación positiva entre la intensidad correspondiente a la *HSPA2* y la fragmentación del ADN determinada por TUNEL en pacientes estériles ($p = 0,044$).

do 1 SNP nuevo no descrito previamente. Este SNP corresponde a la variante c.1443 C>T (p.Phe481Phe) que se observa en heterocigosis en 1 paciente azoospermico con parada madurativa y en un paciente oligoastenoteratozoospermico (tabla 1). El análisis estadístico indica que los genotipos 684 TT y TC se detectan incrementados dentro del grupo de pacientes azoospermicos en comparación con el resto de pacientes (16 pacientes azoospermicos TT + TC y ninguno CC, en comparación con 7 pacientes oligoastenoteratozoospermicos o teratozoospermicos TT + TC y 6 pacientes CC; $p < 0,005$) (tabla 1). Adicionalmente, la frecuencia alélica del alelo 684 T resultó estar incrementada dentro del grupo de pacientes azo-

TABLA 1. Variantes polimórficas encontradas en el gen *HSPA2*, frecuencias alélicas y de genotipos

	Azoospermicos (n = 16)	Oligoastenoteratos (n = 6)	Teratozoospermicos (n = 7)	Controles (n = 4)
	Frecuencia alélica (genotipos)	Frecuencia alélica (genotipos)	Frecuencia alélica (genotipos)	Frecuencia alélica (genotipos)
684 C>T	0,687 T (0,10,6)	0,166 T (2,4,0)	0,285 T (4,2,1)	0,5 T (1,2,1)
1653 C>T	0,031 T (15,1,0)	0,083 T (5,1,0)	0 T (7,0,0)	0 T (4,0,0)
1443 C>T	0,031 T (15,1,0)	0,083 T (5,1,0)	0 T (7,0,0)	0 T (4,0,0)

Se indica la frecuencia alélica correspondiente a cada uno de los SNP y a continuación en paréntesis los distintos genotipos encontrados (homocigoto normal, heterocigoto, homocigoto mutante). Los genotipos 684 TT y TC se detectan incrementados dentro del grupo de pacientes azoospermicos en comparación con el resto de pacientes (16 pacientes azoospermicos TT + TC y ninguno CC en comparación con 7 pacientes oligoastenoteratozoospermicos o teratozoospermicos TT + TC y 6 pacientes CC ($p < 0,005$). También la frecuencia alélica del alelo 684 T resultó estar incrementada dentro del grupo de pacientes azoospermicos (22 alelos T y 10 alelos C en comparación con 8 alelos T y 18 alelos C dentro del resto de pacientes; $p < 0,005$).

ospermicos (22 alelos T y 10 alelos C en comparación con 8 alelos T y 18 alelos C dentro del resto de pacientes; $p < 0,005$) (tabla 1).

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos realizado un estudio mutacional del gen *HSPA2* en distintos grupos de pacientes estériles y hemos detectado 3 polimorfismos, uno de los cuales no se había descrito previamente, y no se ha detectado ninguna mutación patogénica. El estudio mutacional del gen *HSPA2* está justificado por los antecedentes en la bibliografía que indican una expresión del gen correspondiente durante la espermatogénesis^{2,3,9} y la existencia de parada madurativa e infertilidad en ratones *knock-out* para *HSPA2*⁵, datos que sugerían que este gen era un buen candidato para explicar algunos de los casos de infertilidad. Este interés resulta apoyado por los resultados de estudios previos en nuestro laboratorio en los que detectamos la proteína HSPA2 mediante proteómica⁶ y un incremento de la HSPA2 en pacientes estériles con un incremento de lesión germinal determinada por TUNEL⁷ o un incremento de HSPA2 en pacientes astenozoospermicos⁸. En el presente trabajo ampliamos la detección de la correlación mostrando el detalle de los diagramas de dispersión entre los valores de HSPA2 y los resultados de TUNEL (fig. 2). Los resultados confirman la existencia de una correlación positiva entre los valores de HSPA2 y los resultados de TUNEL, si bien también se evidencia un elevado grado de dispersión en los datos sugiriendo la concurrencia de otros factores que independientemente afecten a los resultados de TUNEL o de HSPA2 (fig. 2B).

La realización del estudio mutacional ha requerido el diseño de oligonucleótidos específicos para conseguir amplificar y secuenciar de forma específica el gen *HSPA2* (fig. 1) discriminándolo de pseudogenes y ge-

nes homólogos pertenecientes a la familia de la HSP¹. La secuencia de estos oligonucleótidos y condiciones de PCR se describen por primera vez en este artículo y pueden servir como referencia para estudios posteriores. Los resultados del estudio mutacional excluyen la existencia de mutaciones patogénicas en el grupo de 29 pacientes en los que se ha secuenciado completamente la región codificante del gen *HSPA2*. Este resultado sugiere que la presencia de mutaciones patogénicas en el gen *HSPA2*, en caso de que existan, debe ser una causa relativamente infrecuente de bloqueo madurativo o de alteración de los parámetros seminales en pacientes con dificultades reproductivas. También es importante dar a conocer este resultado, aunque negativo, a la comunidad científica.

En el presente trabajo también hemos detectado la presencia de 3 polimorfismos tipo SNP que no comportan ningún cambio de aminoácido. Dos de los SNP (c.684 C>T, y c.1653 C>T) (tabla 1) ya habían sido comunicados previamente¹⁶, pero el tercer SNP encontrado corresponde a una variante nueva no descrita previamente (c.1443 C>T) (tabla 1) observada en heterocigosis en un paciente azoospermico con parada madurativa y en un paciente oligoastenoteratozoospermico (tabla 1). Es interesante notar que los genotipos 684 TT y TC se detectan incrementados dentro del grupo de pacientes azoospermicos en comparación con el resto de pacientes ($p < 0,005$) (tabla 1). Este resultado sugiere que la presencia del alelo 684 T puede comportarse como un factor de riesgo de azoospermia. No obstante, este resultado no viene apoyado por los resultados recientemente comunicados en una población independiente¹⁶. Ninguno de los otros 2 genotipos detectados demostró estar presente con una frecuencia alélica significativamente incrementada en alguno de los subgrupos de pacientes. La detección de la relación detectada del polimorfismo c.684 C>T y esterilidad en nuestra población resulta coherente con los resultados de un estudio previo utilizando el cerdo como modelo, en donde se

describió una asociación entre polimorfismos del gen *HSPA2* y la calidad espermática^{4,10}.

Como limitación del presente trabajo es preciso indicar que el número de muestras analizadas es relativamente bajo (tabla 1). Por tanto será interesante en un futuro ampliar el estudio para aumentar el tamaño muestral y, por tanto, incrementar la potencia estadística y confirmar la posible implicación de variaciones en el gen de la *HSPA2* en la esterilidad masculina.

Financiación

Subvencionado con un proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología BFU2009-07118.

Bibliografía

- Bonnycastle LL, Yu CE, Hunt CR, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, et al. Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (*HSPA2*). *Genomics*. 1994;23:85-93.
- Govin J, Caron C, Escoffier E, Ferro M, Kuhn L, Rousseaux S, et al. Post-meiotic shifts in *HSPA2*/*HSP70.2* chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J Biol Chem*. 2006;281:37888-92.
- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, et al. Targeted gene disruption of *Hsp70-2* results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:3264-8.
- Huang SY, Chen MY, Lin EC, Tsou HL, Kuo YH, Ju CC, et al. Effects of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of heat shock protein 70.2 gene on semen quality in boars. *Anim Reprod Sci*. 2002;70:99-109.
- Zhu D, Dix DJ, Eddy EM. *HSP70-2* is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development*. 1997;124:3007-14.
- Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics*. 2006;6:4356-69.
- De Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, et al. Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics*. 2007;7:4264-77.
- Martínez-Heredia J, De Mateo S, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum Reprod*. 2008;23:783-91.
- Huszar, G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein *HSPA2*. *Biol Reprod*. 2000;63:925-32.
- Huang SY, Kuo YH, Lee YP, Tsou HL, Lin EC, Ju CC, et al. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Anim Reprod Sci*. 2000;63:231-40.
- Mengual L, Ballescà JL, Ascaso C, Oliva R. Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J Androl*. 2003;24:438-47.
- Botta T, Blescia S, Martínez-Heredia J, Lafuente R, Brassesco M, Ballescà JL, et al. Identificación de diferencias proteómicas en muestras oligozoospermicas. *Rev Int Androl*. 2009;7:14-9.
- Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Ballescà JL, Oliva R. Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A*. 2007;71:1011-8.
- Hossain AM, Rizk B, Behzadian A, Thorneycroft IH. Modified guanidinium thiocyanate method for human sperm DNA isolation. *Mol Hum Reprod*. 1997;3:953-6.
- Gázquez C, Oriola J, De Mateo S, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R. A common protamine 1 promoter polymorphism (-190 C->A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients. *J Androl*. 2008;29:540-8.
- Sanderson ML, Griffin J, Carrell DT. Novel polymorphisms in the *HSPA2* gene among a population of infertile men. Proceedings of the 4th Utah/Florence symposium on the Genetics of Male Infertility. Salt Lake City, USA. 4-6 febrero 2010.