

INHIBIN B MENGHAMBAT EKSPRESI MOLEKUL PROTAMINE P2 DI DALAM KEPALA SPERMATOZOA TIKUS (*Rattus norvegicus*)

Inhibition of Inhibin B on Protamine P2 Molecule Expression in Head of Rat (Rattus norvegicus) Sperm

Aulanni'am¹, Muslim Akmal², M. Aris Widodo³, Sutiman B. Sumitro⁴,
dan Basuki B. Purnomo³

¹Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Malang

²Laboratorium Embriologi dan Histologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

⁴Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang

E-mail: aulanibiochem@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek inhibin B terhadap ekspresi protamine P2 di dalam kepala spermatozoa pada kauda epididimis. Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus jantan berumur 4 bulan yang dikelompokkan secara acak ke dalam 4 kelompok (KO, KI, KII, dan KIII), setiap kelompok terdiri atas 6 ekor tikus. Kelompok KO merupakan kelompok kontrol hanya diinjeksi dengan PBS. Kelompok KI, KII, dan KIII diinjeksi dengan inhibin B dengan dosis masing-masing adalah 25, 50, dan 100 pg/ekor. Tikus diinjeksi sebanyak 5 kali secara intra peritoneal dengan interval waktu pemberian 12 hari selama 48 hari. Injeksi pertama, inhibin B dicampur dengan 0,05 ml PBS dan 0,05 ml CFA. Injeksi kedua hingga kelima, inhibin B dicampur dengan 0,05 ml PBS dan 0,05 ml IFA. Pada hari ke-6 setelah injeksi inhibin B terakhir, hewan coba dikorbankan secara *dislocatio cervicalis* lalu jaringan kauda epididimis dikoleksi dan difiksasi dengan paraformaldehid 4%. Setelah melalui proses dehidrasi, jaringan blok di dalam parafin dipotong dengan ketebalan 6 mikron dan diwarnai secara imunohistokimia dengan menggunakan antibodi anti protamine P2. Pengamatan secara imunohistokimia menunjukkan adanya ekspresi protamine P2 di dalam kepala spermatozoa pada semua kelompok perlakuan. Akan tetapi, seiring dengan penambahan dosis inhibin B menyebabkan terjadinya penurunan tingkat ekspresi protamine P2 di dalam kepala spermatozoa pada kauda epididimis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa injeksi inhibin B dengan dosis 100 pg/ekor menurunkan secara nyata jumlah ekspresi protamine P2 di dalam kepala spermatozoa pada epididimis ($P < 0,05$) dibanding KO.

ABSTRACT

This study aims to know the effect of inhibin B injection on protamine P2 expression in cauda of epididymis. Twenty four of 4 months old male rats were randomly divided into four treatment groups (KO, KI, KII, KIII), each consist of 6 rats. Group KO was control group, only injected with 0.1 ml PBS. Groups KI, KII, KIII were injected intraperitoneally with inhibin B in various doses of 25, 50, 100 pg/rat, respectively. Rats were injected 5 times with the interval of 12 days during 48 days. The first injection was carried out by mixing inhibin B with 0.05 ml PBS and 0.05 ml CFA. The second to fifth injection were injected with inhibin B in 0.05 ml PBS and 0.05 ml IFA. Six days after last injection, six rats of each group were dissected and cauda of epididymis were collected. Following dehydration process, tissue were embedded in paraplast, cut at 6 micron, and stained using immunohistochemistry method. The observation using immunohistochemistry method showed that protamine P2 in KO were distributed in the head of sperm in cauda of epididymis whereas in KIII showed no protamine P2 distribution in the head of sperm in cauda of epididymis. The result of this research showed that the injection of inhibin B with the dose of 100 pg/rat decrease significantly ($P < 0.05$) the expression of protamine P2 in the head of sperm in cauda of epididymis.

PENDAHULUAN

Spermatogenesis merupakan proses yang fundamental di dalam sistem reproduksi pria yang melibatkan serangkaian peristiwa genetik dan epigenetik tingkat tinggi di dalam sel-sel germinal yang berperan penting merubah spermatogonia menjadi spermatozoa (Liu *et al.*, 2008) dan dikendalikan oleh hormon gonadotropin,

yaitu *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH) (Weinbauer *et al.*, 2001). Spermatogenesis terdiri atas tiga tahap utama, yaitu proliferasi spermatogonia, meiosis spermatosit, dan spermiogenesis spermatid haploid (Russell *et al.*, 1990). Selama proses spermiogenesis, *round* haploid memasuki fase elongasi, sel-sel germinal mengalami transformasi dan sejumlah besar histon somatik mengalami

penggantian, yaitu penggantian histon oleh protein transisi dan akhirnya oleh protamine untuk penyusunan DNA ke dalam inti spermatozoa (Sassone-Corsi, 2000). Spermiogenesis merupakan proses yang kompleks yang terdiri dari tiga tahap utama, yaitu tahap *round* spermatid, pemanjangan spermatid (*elongating* spermatid), dan spermatid yang memanjang (*elongated* spermatid) (Ohta *et al.*, 2007).

Hormon FSH merupakan hormon endokrin utama yang meregulasi fungsi sel Sertoli (Boitani *et al.*, 1995) dan berperan penting mengontrol spermatogenesis (Wolfgang *et al.*, 2001). Sekresi inhibin B oleh sel Sertoli dirangsang oleh FSH (Crofton *et al.*, 2002), sebaliknya sekresi dan produksi FSH oleh kelenjar pituitari diregulasi oleh inhibin B (Boepple *et al.*, 2008). Inhibin B merupakan hormon peptida gonadal dimerik yang secara selektif berpotensi menghambat sekresi FSH melalui mekanisme umpan balik negatif (Chada *et al.*, 2003). Inhibin B diproduksi secara nyata oleh sel Sertoli testis (Winters *et al.*, 2006) dan merupakan bentuk utama inhibin pada pria dewasa (McNeilly *et al.*, 2002).

Signal FSH esensial dibutuhkan untuk menginisiasi spermatogenesis pada masa pubertas dan menjaga produksi normal spermatozoa pada usia dewasa (Simoni *et al.*, 1997). Signal transduksi FSH bersama reseptornya (FSH-R) merupakan saat yang kritis dalam menjaga gametogenesis normal pada gonad mamalia (Hermann dan Heckert, 2006). Ikatan antara FSH dan FSH-R pada sel Sertoli akan menginduksi adenilat siklase (*AS*), sehingga menyebabkan peningkatan konsentrasi cAMP intra sel Sertoli. Kondisi ini menyebabkan diaktivasinya cAMP-dependent PKA, yang akhirnya memfosforilasi faktor transkripsi cAMP-responsive element modulator (CREM) pada serin 117 (Groussin dan Bertherat, 1998). Molekul CREM merupakan kunci regulator molekular terhadap seluruh stadium spermatogenesis (Don dan Stelzer, 2002) dan meregulasi ekspresi sejumlah gen *post-meiosis* penting, seperti protein transisi dan protamine (Sassone-Corsi, 1998). Protamine merupakan protein utama di dalam inti spermatozoa yang berikatan dengan DNA. Pada manusia dan tikus, terdapat dua jenis protamine, yaitu protamine P1 dan protamine P2 (Corzett *et al.*, 2002). Protamine berperan penting untuk pembentukan kromatin yang diperlukan pada fungsi normal spermatozoa (Szczygiel dan Ward, 2002). Selama tahap elongasi spermatid pada spermiogenesis,

sekitar 85% inti spermatozoa histon akan diganti oleh protamine (Wykes dan Krawetz, 2003). Penggantian somatik histon oleh protamine berperan penting dalam penyusunan inti kromatin, pematangan spermatozoa (Arpanahi *et al.*, 2009), dan fertilitas (Hammoud *et al.*, 2009) serta berperan penting dalam pemindahan genom ke dalam kepala spermatozoa yang matang (Balhorn *et al.*, 2000). Ekspresi abnormal protamine menyebabkan terjadinya penurunan jumlah spermatozoa, penurunan motilitas dan morfologi spermatozoa, peningkatan kerusakan kromatin spermatozoa (Mengual *et al.*, 2003), penurunan viabilitas spermatozoa, meningkatnya kerusakan DNA spermatozoa (Aoki *et al.*, 2006), dan infertilitas pada pria (Clark dan Civetta, 2000). Hasil penelitian menunjukkan bahwa protamine P2 berperan penting menjaga integritas kromatin spermatozoa manusia (Cho *et al.*, 2003) sedangkan defisiensi protamine P2 diyakini sebagai faktor penyebab dihasilkannya spermatozoa yang immotil (Cho *et al.*, 2001), yang akhirnya menurunkan kemampuan spermatozoa untuk melakukan fertilisasi terhadap sel telur (Carrell dan Liu, 2001) sehingga menyebabkan terjadinya infertilitas pada pria.

MATERI DAN METODE

Isolat inhibin B yang digunakan pada penelitian ini berasal dari hasil isolasi kultur sel Sertoli *Rattus norvegicus* umur 21 hari yang dikultur dengan menggunakan medium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) dan *fetal calf serum* (FCS) 10%. Konfirmasi isolat inhibin B dilakukan dengan menggunakan metode *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS) PAGE, *Dot Blot*, *Western Blot*, dan elektroelusi. Perhitungan konsentrasi isolat inhibin B dengan metode *enzyme linked-immunosorbant assay* (ELISA) didapatkan konsentrasi inhibin B sebesar 1803,33 pg/ μ l.

Pada penelitian ini digunakan 24 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar berjenis kelamin jantan, umur 4 bulan, berat badan 150-200 gram dan dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola satu arah. Seluruh tikus dikelompokkan secara acak ke dalam empat kelompok perlakuan. Kelompok kontrol (KO), tikus diinjeksi dengan 0 pg/ekor inhibin B. Kelompok II, III, dan IV tikus diinjeksi masing-masing dengan 25, 50, dan 100 pg/ekor inhibin B. Injeksi dilakukan secara intra peritoneal sebanyak lima kali dengan selang waktu 12-48 hari. Injeksi pertama, inhibin B dilarutkan dalam

phosphate buffer saline (PBS) 0,05 ml dan 0,05 ml *complete Freund's adjuvant* (CFA). Injeksi ke-2 sampai ke-5 inhibin B dalam PBS 0,05 ml dan 0,05 ml *incomplete Freund's adjuvant* (IFA). Pada hari ke-6 setelah injeksi inhibin B terakhir, hewan coba dikorbakan secara *dislocatio cervicalis*, kauda epididimis dikoleksi dan difiksasi dengan paraformaldehid 4%, lalu dilakukan serangkaian perlakuan mikroteknik untuk mendapatkan sediaan histologi yang selanjutnya diwarnai secara imunohistokimia menggunakan antibodi anti protamine P2. Prosedur pewarnaan imunohistokimia sebagai berikut: preparat dicelup dalam xylol sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit, alkohol absolut sebanyak 2 kali masing-masing selama 3 menit, alkohol 90, 80, dan 70% masing-masing selama 3 menit, lalu dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 5 menit. Selanjutnya, preparat direndam dalam 3% hidrogen peroksida (dalam DI water) selama 15 menit. Kemudian preparat dicuci dalam PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali selama 5 menit. Selanjutnya, preparat direndam kembali dalam 1% BSA dalam PBS selama 30 menit pada suhu ruang, dicuci dalam PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat ditambahkan antibodi primer (antibodi anti protamine P2) dan diinkubasi selama semalam pada suhu 4 C. Kemudian, preparat dicuci dalam PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan antibodi sekunder *Anti-Goat IgG Biotin Labelled* selama 1 jam pada suhu ruang. Pencucian preparat dalam PBS dilakukan sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit dan ditambahkan *strept avidin-horseradish peroxidase* (SA-HRP) selama 20 menit pada suhu ruang. Pencucian dalam PBS pH 7,4 dilakukan sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit dan ditambahkan kromogen *3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB) selama 10 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, preparat dicuci dalam PBS sebanyak 1 kali selama 5 menit dan dilakukan *counterstain* dengan *methyl green* selama 10 menit pada suhu ruang, dicuci dengan aquades, kemudian secara berturut-turut dicuci dengan alkohol 95, 100% dan xylol. Kemudian dilakukan *mounting* dengan *entellan* dan pengamatan preparat dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan terhadap ekspresi protamine P2 pada 30 buah duktus epididimis dianalisis dengan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Tukey HSD dengan menggunakan bantuan program *software SPSS 13,0 for windows*.

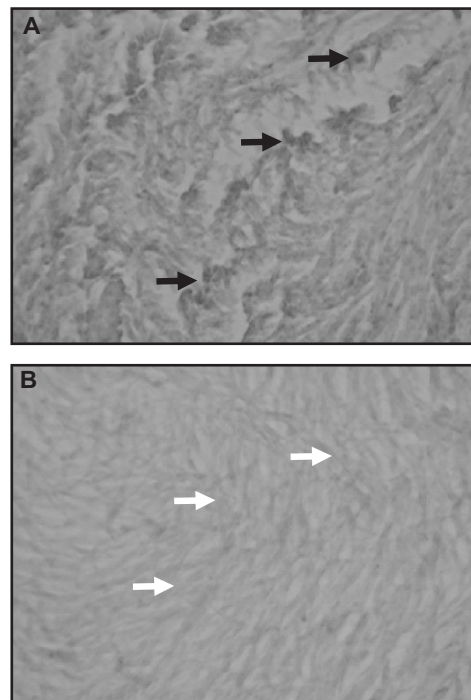
HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekspresi protamine P2 di dalam kauda epididimis disajikan pada Gambar 1, sedangkan hasil pemeriksaan ekspresi protamine P2 di dalam kepala spermatozoa pada 30 buah epididimis bagian kauda setelah injeksi inhibin B disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel 1. Pengaruh injeksi inhibin B terhadap jumlah epididimis yang mengekspresikan protamine P2 di dalam kepala spermatozoa

Kelompok	Rerata Jumlah Epididimis yang Mengekspresikan Protamine P2 dalam Kepala Spermatozoa (X ± SD)
KO	28,50±2,34a
KI	26,83±3,06ab
KII	25,33±3,08ab
KIII	20,83±7,16b

^{a,ab,b} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05).



Gambar 1. Gambaran ekspresi protamine P2 di dalam kepala spermatozoa pada kauda duktus epididimis setelah injeksi dengan inhibin B. Panah hitam (A) pada kelompok kontrol menunjukkan adanya ekspresi protamine P2 di dalam kepala spermatozoa pada kauda duktus epididimis. Panah putih (B) pada kelompok KIII menunjukkan tidak adanya ekspresi protamine P2 di dalam spermatozoa pada kauda epididimis yang ditandai dengan tidak adanya warna coklat pada kepala spermatozoa (400x).

Pada Gambar 1A pada kelompok kontrol terlihat adanya ekspresi protamine P2 di dalam kepala spermatozoa yang sangat nyata sedangkan pada Gambar 1B tidak memperlihatkan adanya ekspresi protamine P2 pada kelompok KIII. Pada Gambar 1A terlihat bahwa kauda epididimis yang telah diwarnai dengan antibodi anti protamine P2 kemudian diwarnai dengan SA-HRP dan kromogen DAB kemudian *counterstain* dengan *methyl green* menunjukkan adanya ekspresi protamine P2 di dalam kepala spermatozoa pada kauda epididimis yang ditandai dengan adanya warna coklat pada kepala spermatozoa yang merupakan visualisasi dari kromogen DAB. Adanya warna coklat di dalam kepala spermatozoa menunjukkan bahwa adanya protamine P2 di dalam kepala spermatozoa yang dikenali oleh antibodi anti protamine P2.

Hasil penghitungan terhadap 30 buah epididimis bagian kauda yang mengekspresikan protamine P2 di dalam kepala spermatozoanya menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara kelompok kontrol dan perlakuan. Uji lanjutan dengan Tukey HSD menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara kelompok KO dan KIII, sedangkan antara kelompok kontrol dan KI, KII; KI dan KII, KIII; dan KII dan KIII tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) (Tabel 1).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa injeksi inhibin B dengan dosis 100 pg/ekor menyebabkan penurunan ekspresi protamine P2 di dalam kepala spermatozoa secara nyata ($P < 0,05$) pada kauda epididimis dibanding dengan kelompok kontrol. Penurunan ekspresi protamine P2 pada penelitian ini berkaitan erat dengan terjadinya penurunan konsentrasi FSH dan ekspresi FSH di dalam sel Sertoli akibat injeksi inhibin B. Penurunan konsentrasi FSH menyebabkan terjadinya penurunan ekspresi CREM di dalam sel Sertoli (Akmal, 2011). Penurunan ekspresi CREM menyebabkan terganggunya regulasi ekspresi protamine P2 di dalam kepala spermatozoa pada kauda epididimis. Oleh karena itu, dapat dipastikan bahwa hewan coba pada kelompok KIII mengalami gangguan spermatogenesis dan mempunyai kualitas spermatozoa yang rendah.

Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa eratnya hubungan antara protamine dan infertilitas pria (Aoki *et al.*, 2006). Protamine merupakan protein inti dasar spermatozoa (Krawetz dan Dixon, 1986) dengan berat molekul yang kecil (Khara *et al.*, 1997). Protamine berperan penting untuk pembentukan kromatin

yang diperlukan pada fungsi normal spermatozoa (Szczygiel dan Ward, 2002). Ekspresi abnormal protamine menyebabkan terjadinya penurunan jumlah spermatozoa, penurunan motilitas dan morfologi spermatozoa, peningkatan kerusakan kromatin spermatozoa (Mengual *et al.*, 2003), penurunan viabilitas spermatozoa, dan meningkatnya kerusakan DNA spermatozoa (Aoki *et al.*, 2006). Protamine meningkatkan ratio penyusunan kromatin spermatozoa yang penting untuk meningkatkan fungsi dan motilitas spermatozoa (McLay dan Clarke, 2003). Motilitas spermatozoa diyakini sebagai parameter terpenting untuk mengevaluasi kemampuan spermatozoa melakukan fertilisasi terhadap sel telur baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Hirano *et al.*, 2001).

Ekspresi protamine yang abnormal menyebabkan gangguan tahap akhir spermiogenesis yang akhirnya menurunkan kemampuan spermatozoa untuk melakukan fertilisasi terhadap sel telur (Carrell dan Liu, 2001) sehingga menyebabkan terjadinya infertilitas pada pria. Menurut Hecht *et al.* (2009) protamine bukan hanya dibutuhkan untuk keberhasilan proses fertilisasi, namun juga dibutuhkan terhadap perkembangan embrio preimplantasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protamine P2 berperan penting menjaga integritas kromatin spermatozoa manusia (Cho *et al.*, 2003) sedangkan defisiensi protamine P2 diyakini sebagai faktor penyebab dihasilkannya spermatozoa yang immotil (Cho *et al.*, 2001). Sejumlah kasus menunjukkan bahwa infertilitas tersebut terjadi akibat terjadinya defisiensi protamine P2 (Aoki *et al.*, 2005) di dalam kepala spermatozoa. Secara lebih spesifik Cho *et al.* (2003) menyatakan bahwa haploinsufisiensi protamine P2 pada tikus menyebabkan terjadinya peningkatan kerusakan DNA di dalam kepala spermatozoa, gangguan penyusunan kromatin, perubahan kepala spermatozoa, dan perubahan pada akrosom. Selain itu hasil penelitian Martin-Coello *et al.* (2010) menunjukkan bahwa defisiensi protamine P2 menyebabkan perubahan dimensi kepala spermatozoa dan menurunkan kecepatan berenang spermatozoa.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa injeksi inhibin B dengan dosis 100 pg/ekor menyebabkan penurunan ekspresi protamine P2 di dalam kepala spermatozoa pada kauda epididimis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui Program Hibah Penelitian untuk Mahasiswa Program Doktor DP2M DITJEN DIKTI melalui DIPA Universitas Brawijaya No. 0174.0/023-04-2/XV/2009 tanggal 31 Desember 2008.

DAFTAR PUSTAKA

- Akmal, M. 2011. Inhibin B Berpotensi Menghambat Proses Spermatogenesis secara *Reversible* melalui Penurunan Konsentrasi dan Ekspresi *Follicle-Stimulating Hormone* (FSH), *cAMP-Responsive Element Modulator* (CREM), Protamine P2, dan Kualitas Spermatozoa. **Disertasi**. Program Pascasarjana, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Aoki, V.W., L. Liu, and D.T. Carrell. 2005. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. **Human Reproduction**. 20(5):1298-1306.
- Aoki, V.W., L. Liu, and D.T. Carrell. 2006. A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. **Molecular Human Reproduction**. 12(1):41-50.
- Arpanahi, A., M. Brinkworth, D. Iles, S.A. Krawetz, A. Paradowska, A.E. Platts, M. Saida, K. Steger, P. Tedder, and D. Miller. 2009. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. **Genome Research**. 19:1338-1349.
- Balhorn, R., L. Brewer, and M. Corzett. 2000. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: Analysis of toroid stability using single DNA molecules. **Mol. Reprod. Dev**. 56:230-234.
- Boepple, P.A., F.J. Hayes, A.A. Dywer, T. Raivio, H. Lee, W.F. Crowley Jr., and N. Pitteloud. 2008. Relative roles of inhibin B and sex steroid in the negative feedback regulation of follicle-stimulating hormone in men across the full spectrum of seminiferous epithelium function. **J. Clin. Endocrin. Metab**. 10:1-14.
- Boitani, C., M. Stefanini, A. Fragale, and A.R. Morena. 1995. Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis development. **Endocrinology**. 136:5438-5444.
- Carrell, D.T. and L. Liu. 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.
- Chada, M., R. Prusa, J. Bronsky, K. Kotaska, K. K. Sidlova, M. Pechova, and L. Lisa. 2003. Inhibin B, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone during childhood and puberty in males: Changes in serum concentration in relation to age and stage of puberty. **Physiol. Res**. 52:45-51.
- Cho, C., W.D. Willis, E.H. Gouling, H. Jung-Ha, Y.C. Choi, N.B. Hecth, and E.M. Eddy. 2001. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. **Nat. Genet**. 28(1):10-12.
- Cho, C., H. Jung-Ha, W.D. Willis, E.H. Goulding, P. Stein, Z. Xu, R.M. Schultz, N.B. Hecth, and E.M. Eddy. 2003. Protamine-2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. **Biol. Reprod**. 69:211-217.
- Clark, A.G. and A. Civetta. 2000. Protamine wars. **Nature**. 403:261-263.
- Corzett, M., J. Mazrimas, and R. Balhorn. 2002. Protamine 1: Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. **Mol. Reprod. Dev**. 61:519-527.
- Crofton, P.M., A.E.M. Evans, N.P. Groome, M.R.H. Taylor, C.V. Holland, and C.J.H. Kelnar. 2002. Inhibin B in boys from birth to adulthood: relationship with age, pubertal stage, FSH and testosterone. **Clin. Endocrinol**. 56:215-221.
- Don, J. and G. Stelzer. 2002. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. **Mol. Cell Endocrinol**. 187(1-2):115-124.
- Groussin, L. and J. Bertherat. 1998. Transcriptional regulation by cyclic AMP is essential for development, reproduction and survival: Lessons from the transgenic mice. **European Journal of Endocrinology**. 139:571-572.
- Hammoud, S., B.R. Emery, D. Dunn, R.B. Weiss, and D.T. Carrell. 2009. Sequence alterations in the YBX2 gene are associated with male factor infertility. **Fertil. Steril**. 91:1090-1095.

- Hecht, N., R. Behr, A. Hild, M. Bergmann, W. Weidner, and K. Steger. 2009. The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model for histon and protamine expression during human spermatogenesis. **Human Reproduction**. 24(3):536-545.
- Hermann, B.P. and L.L. Heckert. 2006. Transcriptional regulation of the FSH receptor: New perspectives. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 260-262:100-108.
- Hirano, Y., H. Shibabara, H. Obara, T. Suzuki, S. Takamizawa, C. Yamaguchi, H. Tsunoda, and I. Sato. 2001. Relationships between sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. **J. Assist Reprod. Gene**. 18:213-218.
- Khara, K.K., M. Vlad, M. Griffiths, and C.R. Kennedy. 1997. Human protamines and male infertility. **J. Assist Reprod. Genet**. 14:282-290.
- Krawetz, S.A. and G.H. Dixon. 1986. Sequence similarities of the protamine genes: Implications for regulation and evolution. **J. Mol. Evol**. 27:291-297.
- Liu, P.Y., R.S. Swedloff, B.D. Anawalt, R.A. Anderson, W.J. Bremner, J. Elliesen, Yi-Qun Gu, W.M. Kersemaekers, R.I. McLachlan, M.C. Meriggiola, E. Nieschlag., R. Sitruk-Ware, K. Vogelsong, Xing-Hai Wang, F.C.W. Wu, M. Zitzmann, D.J. Handelsman, and C. Wang. 2008. Determinants of the rate and extent of spermatogenic suppression during hormonal male contraception: An integrated analysis. **J. Clin. Endocrinol. Metab**. 93(5):1774-1783.
- Martin-Coello, J., H. Dopazo, L. Arbiza, J. Ausio, E.R.S. Roldan, and M. Gomendio. 2009. Sexual selection drives weak positive selection in protamine genes and high promoter divergence, enhancing sperm competitiveness. **Proc. R. Soc. B**. 276:2427-2436.
- McLay, D.W and H.J. Clarke. 2003. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction**. 125: 625-633.
- McNeilly, A.S., C.J. Souja, D.T. Baird, I.A. Swanston, J. McVerry, J. Cranfield, and G.A. Lincoln. 2002. Production of inhibin a not b in rams: changes in plasma inhibin a during testis growth, and expression of inhibin /activin subunit mrna and protein in adult testis. **J. Reproduction**. 123:827-835.
- Mengual, L., J.L. Balleca, C. Ascaso, and R. Oliva. 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.
- Ohta, T., H. Miyake, C. Miura, H. Kamei, K. Aida, and T. Miura. 2007. Folliclestimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. **Biology of Reproduction**. 77:970-977.
- Russell, L.D., R.A. Ettlin, A.P.S Hikim, and E.D. Clegg. 1990. **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis**. Cache River Press, Clearwater.
- Sassone-Corsi, P. 1998. CREM: A master-switch governing male germ cell differentiation and apoptosis. **Proceeding in Developmental Biology**. 9:475-482.
- Sassone-Corsi, P. 2000. CREM: A master-switch regulating the balance between differentiation and apoptosis in the mala germ cells. **Mol. Reprod Dev**. 56:228-229.
- Simoni, M.J., B. Gromoli, and E. Nieschlag. 1997. The follicle-stimulating hormone receptor: Biochemistry, molecular biology, physiology, and patophysiology. **Endocrine Reviews**. 18(6):739-773.
- Szczygiel, M.A and W.S. Ward. 2002. Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage. **Biol. Reprod**. 67:1532-1537.
- Weinbauer, G.F., S. Schlatt, V. Walter, and E. Nieschlag. 2001. Testosterone-induced inhibition of spermatogenesis is more closely related to suppression of FSH than to testicular androgen levels in the cynomolgus monkey model (*Macaca fascicularis*). **Journal of Endocrinology**. 168:25-38.
- Winters, S.J., C. Wang, E. Abdelrahman, V. Hadeed, M.A. Dyky, and A. Brufsky. 2006. Inhibin B levels in healthy young adult men and prepubertal boys: is obesity the cause for the contemporary decline in sperm count because of fever sertoli cells? **Journal of Andrology**. 27(4):560-564.
- Wolfgang, M.J., R.L. Grendel, and T.G. Golos. 2001. Molecular cloning of three nonhuman primate follicle stimulating hormone β -subunit cDNAs. **J. Med Primato**. 30:299-303.
- Wykes, S.M. and S.A. Krawetz. 2003. The structural organization of sperm chromatin. **The Journal of Biological Chemistry**. 278(32):29471-29477.