

# INHIBIN B MENURUNKAN KONSENTRASI *FOLLICLE STIMULATING HORMONE* (FSH) PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*): UPAYA PENGEMBANGAN KONTRASEPSI HORMON PRIA BERBASIS PEPTIDA

## *Inhibin B Decrease the Concentration of Follicle Stimulating Hormone (FSH) on White Rat (Rattus norvegicus): The Development of Peptide Based Male Hormonal Contraception*

Muslim Akmal<sup>1</sup>, Aulanni'am<sup>2</sup>, M. Aris Widodo<sup>3</sup>, Sutiman B. Sumitro<sup>4</sup>, Basuki B. Purnomo<sup>3</sup>, Tongku Nizwan Siregar<sup>5</sup>, Muhammad Hambal<sup>6</sup>, Amiruddin<sup>7</sup>, Syafruddin<sup>7</sup>, Dwinna Aliza<sup>8</sup>, Arman Sayuti<sup>7</sup>, Mulyadi Adam<sup>9</sup>, T. Armansyah<sup>10</sup>, dan Erdiansyah Rahmi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Embriologi dan Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>2</sup>Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, Malang

<sup>3</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

<sup>4</sup>Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang

<sup>5</sup>Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>6</sup>Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>7</sup>Laboratorium Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>8</sup>Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>9</sup>Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>10</sup>Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: muslim\_akmal70@yahoo.com

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek injeksi inhibin B terhadap penurunan konsentrasi *follicle stimulating hormone* (FSH) di dalam serum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Dalam penelitian ini digunakan 24 ekor tikus putih berjenis kelamin jantan dengan strain Wistar berumur 4 bulan dengan bobot badan 150-200 g. Tikus-tikus dikelompokkan secara acak ke dalam 4 kelompok, yaitu KK0, KP1, KP2, dan KP3, masing-masing kelompok terdiri atas 6 ekor. Kelompok KK0 merupakan kelompok kontrol hanya diinjeksi dengan *phosphate buffer saline* (PBS), sedangkan kelompok KP1, KP2, dan KP3 diinjeksi dengan inhibin B dengan dosis berturut-turut 25, 50, dan 100 pg/ekor. Injeksi inhibin B dilakukan secara intraperitoneum sebanyak 5 kali selama 48 hari dengan interval waktu 12 hari. Injeksi pertama inhibin B dilarutkan dengan 0,05 ml PBS dan 0,05 ml *Freud's complete adjuvant* (FCA). Injeksi kedua sampai kelima, inhibin B dilarutkan dengan 0,05 ml PBS dan 0,05 ml *Freud's incomplete adjuvant* (FICA). Pada hari ke-6 setelah injeksi inhibin B terakhir, tikus dikorbankan secara *dislocatio cervicalis*, lalu darah dikoleksi langsung dari jantung dan didiamkan hingga didapatkan serum untuk pemeriksaan konsentrasi FSH dengan menggunakan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Hasil penelitian menunjukkan bahwa injeksi inhibin B dengan dosis 100 pg/ekor menurunkan konsentrasi FSH secara nyata ( $P < 0,05$ ) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Berdasarkan hal tersebut, inhibin B berpeluang untuk dikembangkan sebagai kandidat kontrasepsi pria hormon berbasis peptida.

Kata kunci: inhibin B, FSH, kontrasepsi, spermatozoa, *Rattus norvegicus*

### ABSTRACT

This study aims to know the effect of inhibin B injection on FSH concentration in serum of white rat (*Rattus norvegicus*). In this research, twenty four of 4 months old male rats were used randomly divided into four treatment groups, KK0, KP1, KP2, and KP3, each consist of 6 rats. Group KK0 was control group, only injected with phosphate buffer saline (PBS). Groups KP1, KP2, and KP3 were injected intraperitoneally with inhibin B in various doses of 25, 50, 100 pg/rat, respectively. Injections of inhibin B were done 5 times intraperitoneally 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 *Freud's complete adjuvant* (FCA). The second to fifth injection were injected with inhibin B in 0.05 ml PBS and 0.05 ml *Freud's complete adjuvant* (FICA). Six days after last injection, rats were dissected, blood was collected directly from the heart for examination of the FSH concentration using enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) method. The result of this research showed that the injection of inhibin B with dose 100 pg/rat decrease the concentration of FSH significantly ( $P < 0,05$ ). Thus, inhibin B can be developed as peptide based male hormonal contraception.

Key words: inhibin B, FSH, contraception, spermatozoa, *Rattus norvegicus*

### PENDAHULUAN

Sistem reproduksi jantan (pria) merupakan target yang potensial untuk pengembangan bahan atau obat kontrasepsi baru (Anderson dan Baird, 2002). Hal tersebut sangat beralasan mengingat pertambahan penduduk dunia yang terus meningkat setiap tahun (Crosignani, 2002). Data menunjukkan bahwa pada akhir tahun 2050, penduduk dunia diperkirakan akan mencapai sekitar 9,5 milyar jiwa (United Nations Population Division, 2000).

Untuk mengantisipasi ledakan penduduk dunia tersebut, *World Health Organization* (WHO) telah mengembangkan kontrasepsi hormon pria (WHO, 1998) yang diyakini sebagai metode kontrasepsi yang aman, efektif (Anderson dan Baird, 2002), dan akseptabel (Heinemann *et al.*, 2005) serta praktis bagi pria (Sjogren dan Gottlieb, 2001). Kontrasepsi hormon pria bekerja pada berbagai level di dalam sumbu hipotalamus-pituitari-testis dan bekerja menginduksi produksi gonadotropin oleh kelenjar pituitari dan androgen testis serta spermatogenesis secara terus-

menerus (Matthiesson dan Lachlan, 2006). Salah satu bahan yang berpotensi digunakan sebagai kandidat kontrasepsi hormon pria adalah inhibin B.

Inhibin B merupakan hormon glikoprotein dengan dua subunit *dissimilar* ( $\alpha/\beta$ B) yang secara endokrinologi merupakan bentuk inhibin yang paling penting pada pria (Anawalt *et al.*, 1996) dan diproduksi oleh sel Sertoli testes (Marchetti *et al.*, 2003), sedangkan *follicle stimulating hormone* (FSH) merupakan hormon gonadotropin utama yang memengaruhi spermatogenesis (Sambrovi *et al.*, 2013) yang berperan penting dalam menginduksi dan menjaga spermatogenesis pada manusia (Sutcliffe *et al.*, 2006; Ohta *et al.*, 2007). Inhibin B meregulasi sekresi FSH melalui regulasi umpan balik (*feedback*) negatif (De Kretser *et al.*, 2000), sedangkan sekresi inhibin B oleh sel Sertoli testes dirangsang oleh FSH (Crofton *et al.*, 2002). Sistem kontrol umpan balik FSH diregulasi secara nyata oleh inhibin B (Anderson dan Sharpe, 2000). Menurut Hayes *et al.* (2001), regulasi umpan balik FSH sangat baik digunakan sebagai dasar untuk pengembangan kontrasepsi hormon pada pria. Penelitian ini bertujuan mengetahui efek pemberian inhibin B terhadap penurunan konsentrasi FSH dan kaitannya dalam upaya pengembangan kontrasepsi hormon berbasis peptida pada pria dengan menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba.

## MATERI DAN METODE

### Produksi Isolat Inhibin

Dalam penelitian ini digunakan isolat inhibin B dengan berat molekul (BM) 32 kDa yang diperoleh dari testis tikus putih yang berumur 21 hari. Isolat inhibin B setelah melalui serangkaian tahapan penelitian mulai dari konfirmasi ekspresi inhibin B pada sel Sertoli testis tikus umur 21 hari secara imunohistokimia menggunakan antibodi anti-inhibin B. Selanjutnya, dilakukan kultur sel Sertoli menggunakan medium *dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) dan *fetal calf serum* (FCS) 10%. Kemudian untuk memastikan kultur sel Sertoli menghasilkan inhibin B, maka dilakukan konfirmasi dengan metode *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS PAGE), *Dot Blot*, *Western Blot*, dan akhirnya elektroelusi. Selanjutnya dengan menggunakan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dilakukan penghitungan konsentrasi inhibin B. Dari hasil penghitungan didapatkan bahwa konsentrasi inhibin B yang diperoleh adalah sebesar 1803,33 pg/ $\mu$ l (Akmal, 2011). Inhibin B yang diperoleh ini, kemudian diinjeksikan kepada hewan coba sesuai dengan dosis yang telah ditetapkan pada masing-masing kelompok.

### Hewan Coba

Penelitian ini dirancang menggunakan rancangan acak lengkap pola satu arah. Dalam penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar sebanyak 24 ekor. Tikus putih yang digunakan berumur umur 4 bulan dengan

berat badan sekitar 150-200 g dan berjenis kelamin jantan. Seluruh tikus dikelompokkan secara acak ke dalam empat kelompok perlakuan. Kelompok kontrol (KK), diinjeksi dengan 0 pg/ekor inhibin B, sedangkan kelompok KP1, KP2, dan KP3, masing-masing tikus diinjeksi dengan 25, 50, dan 100 pg/ekor inhibin B. Injeksi inhibin B dilakukan secara intraperitoneum sebanyak lima kali dengan selang waktu 12 hari (berdasarkan masa satu siklus tubulus seminiferus, yaitu 12 hari dan satu masa spermatogenesis tikus, yaitu 48 hari) (Johnson dan Everitt, 2000). Injeksi pertama dianggap hari ke-0, sedangkan injeksi selanjutnya dilakukan berturut-turut pada hari ke-12, 24, 36, dan 48. 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, 3, 4, dan 5 inhibin B dilarutkan dalam PBS 0,05 ml dan 0,05 ml *incomplete Freund's adjuvant* (IFA). Pada hari ke-6 setelah injeksi inhibin B terakhir, semua tikus dikorbankan secara *dislocatio cervicalis*, lalu dilakukan koleksi darah langsung dari jantung dengan menggunakan *disposable syringe* 5 ml dan didiamkan beberapa saat untuk memperoleh serum yang akan digunakan untuk pemeriksaan konsentrasi FSH dengan menggunakan metode ELISA.

### Pengukuran Konsentrasi FSH

Pengukuran konsentrasi FSH dilakukan sebagai berikut: mikroplate 96 *well* dilakukan *coating* dengan inhibin B sebanyak 100  $\mu$ l, lalu diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 4° C. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan PBS-Tween dengan konsentrasi 0,05% sebanyak 6 kali, lalu diblok dengan *bovine serum albumine* (BSA) *grade 5* dengan konsentrasi 1% dan dicuci dengan 0,05% PBS-Tween 20. Setelah itu, direaksikan dengan 100  $\mu$ l antibodi anti-FSH, lalu diinkubasikan pada suhu 37° C selama 1,5 jam. Selanjutnya dilakukan pencucian sebanyak 6 kali, lalu direaksikan dengan antibodi sekunder anti *rabbit IgG AP conjugated* dan selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37° C selama 1,5 jam. Kemudian dicuci, dan selanjutnya ditambahkan substrat pNPP. Apabila warna pada kontrol sudah berubah menjadi warna kuning maka reaksi segera dihentikan (Akmal, 2011). Hasil konsentrasi FSH dibaca pada ELISA *reader* sistem BIORAD dengan panjang gelombang 405 nm.

### Analisis Data

Konsentrasi FSH dianalisis dengan uji *analysis of variance* (ANOVA). Data yang menunjukkan hasil yang signifikan, dilanjutkan dengan uji Tukey HSD dengan menggunakan program *software* SPSS 13,0 for windows.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil perhitungan terhadap konsentrasi FSH setelah injeksi inhibin B disajikan pada Tabel 1. Dari hasil penelitian diketahui bahwa semakin besar dosis injeksi inhibin B, maka semakin nyata penurunan konsentrasi FSH.

**Tabel 1.** Penurunan Konsentrasi FSH setelah injeksi Inhibin B

Kelompok	Rerata konsentrasi FSH (ng/ml) (X ± SD)
KK0	628,09 ± 308,77 <sup>a</sup>
KP1	422,15 ± 296,95 <sup>ab</sup>
KP2	419,77 ± 210,90 <sup>ab</sup>
KP3	212,62 ± 122,18 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa injeksi inhibin B menyebabkan terjadinya penurunan konsentrasi FSH pada tikus. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa inhibin B menurunkan sekresi FSH pada pria (Elsholz *et al.*, 2004). Hasil penelitian lain pada manusia menunjukkan bahwa level serum inhibin B berkorelasi erat dengan level serum FSH dan konsentrasi testosteron (Raivio *et al.*, 2000). Selain itu, serum inhibin B berkorelasi signifikan dengan konsentrasi spermatozoa dan berkorelasi negatif dengan konsentrasi FSH (Eldar-Geva *et al.*, 2010).

Injeksi inhibin B pada penelitian ini mengakibatkan terganggunya mekanisme molekuler sekresi FSH di dalam hipofisa anterior oleh *activin*. *Activin* adalah molekul yang berperan penting dalam menginduksi sintesis dan sekresi FSH di dalam hipofisa anterior (Bernard dan Stella, 2013). Di dalam sitosol sel-sel gonadotrop, dimerik *activin* berikatan dengan reseptor tipe II serine-threonine kinase, seperti *activin receptor 2A* (ACVR2A). Selanjutnya reseptor-reseptor tipe I, seperti *activin-like kinase* (ALK)4 atau ALK7, akan ditarik ke dalam trans-fosforilasi dan kompleks oleh reseptor-reseptor tipe II. Setelah reseptor-reseptor tipe I teraktivasi maka akan terjadi fosforilasi dan aktivasi sinyal protein intraseluler SMAD2 dan SMAD3. Kedua SMAD ini selanjutnya akan bekerjasama dengan co-SMAD, SMAD4, dan berakumulasi di dalam nukleus (inti sel). Kompleks SMAD tersebut selanjutnya meregulasi promotor melalui mekanisme yang berbeda. Sebagai contoh, SMAD2-SMAD3-SMAD4 berikatan dengan 8-bp SMAD-binding element (SBE) di dalam promotor tikus. SMAD-SMAD tersebut juga bekerjasama dengan faktor transkripsi spesifik gonadotrop/*thyrotroph* FOXL2 untuk meregulasi transkripsi FSH sub unit beta (*Fshb*) (Bernard dan Stella, 2013). Injeksi inhibin B menyebabkan gangguan ikatan antara *activin* dengan reseptor ACVR2A, yang selanjutnya mengganggu ekspresi sejumlah molekul-molekul yang berperan penting dalam sekresi subunit *Fshb*. Hal tersebut selanjutnya berdampak terhadap sintesis dan sekresi FSH oleh kelenjar pituitari sehingga menyebabkan terjadinya penurunan konsentrasi FSH.

Penurunan konsentrasi FSH menyebabkan terganggunya ikatan antara FSH dan reseptornya (FSH-R) di dalam sel Sertoli. Hasil penelitian Walker dan Cheng (2005) menunjukkan bahwa ikatan antara FSH dan FSH-R di dalam sel Sertoli akan menginduksi aktivasi 5 (lima) *pathway* molekuler, yaitu *pathway cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A* (cAMP-PKA), *pathway* kalsium, *pathway mitogen-*

*activated protein* (MAP) kinase, *pathway phospholipase A2*, dan *pathway phosphatidylinositol 3-Kinase*. Berdasarkan hal tersebut maka dapat dipahami bahwa penurunan konsentrasi FSH akibat injeksi inhibin B akan mengganggu induksi 5 *pathway* molekuler FSH di dalam sel Sertoli.

Data menunjukkan bahwa ikatan antara FSH dan FSH-R pada sel Sertoli akan menginduksi *adenylate cyclase* (AC), sehingga meningkatkan level cAMP intra sel Sertoli. Hal tersebut menyebabkan diaktivasinya *cAMP-dependent* PKA, yang akhirnya memfosforilasi faktor transkripsi *cAMP responsive element modulator* (CREM) pada serin 117 (Groussin dan Bertherat, 1998). Hasil penelitian menunjukkan bahwa CREM berperan sangat penting pada spermatogenesis tikus (Gellersen *et al.*, 2002) dan manusia (Peri dan Serio, 2000). Hal tersebut berdasarkan kenyataan bahwa apabila terjadi mutasi pada CREM, maka akan menginduksi terjadinya hambatan pada proses spermiogenesis (Nantel *et al.*, 1996). Steger *et al.* (1999) menyatakan bahwa CREM merupakan molekul yang berperan sebagai kunci regulator spermiogenesis pada testis primata (Weinbauer *et al.*, 1998). Selain itu, Sassone-Corsi (2000) menemukan bahwa CREM juga berperan sebagai kunci kontrol terhadap sejumlah gen spesifik haploid.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada tikus yang mengalami defisiensi CREM akan memengaruhi ekspresi *protamine*, sehingga menyebabkan terjadinya infertilitas akibat terjadinya gangguan pematangan *round* spermatid (Blendy *et al.*, 1996). *Protamine* merupakan protein inti utama spermatozoa dan berfungsi sebagai pengikat dan pematangan DNA ke dalam inti kepala spermatozoa (Tanaka *et al.*, 2003). Fakta penelitian menunjukkan bahwa gangguan ekspresi *protamine* akan menginduksi 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 (Aoki *et al.*, 2005). Fakta penelitian lain menunjukkan bahwa defisiensi *protamine* di dalam inti kepala spermatozoa manusia berkorelasi signifikan dengan terjadinya kemunduran parameter kualitas semen, kemampuan fungsional spermatozoa, dan integritas DNA spermatozoa (Carrell dan Liu, 2001). Selain itu, defisiensi *protamine* juga menyebabkan terjadinya penurunan jumlah spermatozoa, gangguan motilitas spermatozoa, kecacatan kepala spermatozoa, dan gangguan kemampuan penetrasi spermatozoa ke dalam ovum (Aoki *et al.*, 2006).

Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa injeksi inhibin B menyebabkan penurunan ekspresi *protamine* pada kepala spermatozoa tikus putih (Aulanni'am *et al.*, 2011). Hal tersebut terjadi akibat adanya penurunan ekspresi CREM di dalam sel Sertoli (Akmal, 2011), yang selanjutnya berdampak terhadap penurunan motilitas spermatozoa (Akmal *et al.*, 2011a), konsentrasi dan viabilitas spermatozoa (Akmal, 2011), dan penurunan jumlah anak hasil fertilisasi *in vivo*

(Akmal *et al.*, 2011b). Oleh karena itu, dapat dipahami bahwa injeksi inhibin B menyebabkan penurunan konsentrasi FSH sehingga mengganggu ikatan antara FSH dan FSH-R di dalam sel Sertoli. Hal tersebut akan menyebabkan terjadinya gangguan aktivasi *pathway signaling* FSH di dalam sel Sertoli yang pada akhirnya akan mengganggu induksi ekspresi sejumlah molekul penting khususnya CREM dan *protamine* sehingga menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa dan infertilitas.

### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa injeksi inhibin B menurunkan konsentrasi FSH.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui Program Penelitian Hibah Doktor DP2M Ditjen Dikti. Selain itu, penulis juga berterima kasih kepada saudara Hilman, Dedi, dan Harmaji yang telah banyak membantu sehingga penelitian dapat berjalan dengan baik.

### 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.
- Akmal, M., Aulanni'am, M.A. Widodo, S.B. Sumitro, dan B.B. Purnomo. 2011a. Inhibin B menurunkan motilitas spermatozoa *Rattus norvegicus*: Upaya Pengembangan kontrasepsi pria berbasis hormon peptida. **Media Kedokteran Hewan**. 27(2): 89-94.
- Akmal M., Aulanni'am, M.A. Widodo, S.B. Sumitro, and B.B. Purnomo. 2011b. Inhibin B menurunkan jumlah anak hasil fertilisasi *in vivo* pada tikus (*Rattus norvegicus*) secara *reversible*: Upaya pengembangan kontrasepsi pria berbasis hormon peptida. **Media Kedokteran Hewan**. 27(1):11-15.
- Anawalt, B.D., R.A. Bebb, A.M. Matsumoto, N.P. Groome, P.J. Illingworth, A.S. McNeilley, and W.J. Bremner. 1996. Serum inhibin B levels reflect sertoli cell in normal men and men with testicular dysfunction. **J. Clin. Endocrinol Metab**. 81:3341-3345.
- Anderson, R.A and D.T. Baird. 2002. Male Contraception. **Endocrine Reviews**. 23(6):735-762.
- 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. **Mol. Human Reproduction**. 12(1):41-50.
- Aulanni'am, M. Akmal, M.A. Widodo, S.B. Sumitro, dan B.B. Purnomo. 2011. Inhibin B menghambat ekspresi molekul protamine P2 di dalam kepala spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*). **J. Ked. Hewan**. 5(2):78-83.
- Bernard, D.J. and T. Stella. 2013. Mechanisms of activin-stimulated FSH synthesis: The story of a pig and a fox. **Biol. Reproduction**. 88(3):1-10.
- Blendy, J.A., K.H. Kaestner, G.F. Weinbauer, F. Nieschlag, and G. Schütz. 1996. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. **Nature**. 380:162-165.
- 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.
- 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.
- Crosignani, P.G. 2002. Hormonal contraception: What is new? **Hum. Reprod. Update**. 8(4):359-371.
- De Kretser, D.M., A. Meinhardt, T. Meehan, D.J. Phillips, M.K. O'Bryan, and K.A. Loveland. 2000. The roles of inhibin and related peptides in gonadal function. **Mol. Cell Endocrinol**. 161:43-46.
- Daniel, D.E., P. Vasantha, L.R. Robert, R.O. Pamela, J.P. David, and M.F. Carol. 2004. GnRH agonist stimulation of the pituitary-gonadal axis in children: Age and sex differences in circulating inhibin-B and activin-A. **Hum. Reprod**. 19(12):2748-2758.
- Eldar-Geva, T., L. Gad, C. Boris, F. Alon, F. Amicur, J.M. Ehud, and M.S. Irving. 2010. Relationships between FSH, inhibin B, anti-Mullerian hormone, and testosterone during long-term treatment with the GnRH-agonist histrelin in patients with prostate cancer. **European J. Endocrinol**. 162:177-181.
- Gellersen, B., R. Kempf, R. Sandhowe, G.F. Weinbauer, and R. Behr. 2002. Novel leader exons of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element modulator (CREM) gene, transcribed from promoters P3 and P4, are highly testis-specific in primates. **Mol. Hum. Reprod**. 8(11):965-976.
- Groussin, L. and J. Bertherat. 1998. Transcriptional regulation by cyclic AMP is essential for development, reproduction and survival: lessons from the transgenic mice. **European J. Endocrinol**. 139:571-572.
- Hayes, F.J., J.E. Hall, P.A. Boepple, and W.F. Crowley. 1998. Differential control of gonadotropin secretion in the human: endocrine role of inhibin. **J. Clin. Endocrinol. Metab**. 83:1835-1841.
- Heinemann, K., F. Saad, M. Wiesemes, S. White, and L. Heinemann. 2005. Attitudes toward male fertility control: Results of a multinational survey on four continents. **Hum. Reprod**. 20:549-556.
- Johnson, M.H. and B.J. Everitt. 2000. **Essential Reproduction**. 5<sup>th</sup> ed. Blackwell Science Ltd. London.
- Marchetti, C., M. Hamdane, V. Mitchell, K. Mayo, L. Devisme, J.M. Rigot, J.C. Beauvillain, C. Hermand, and A. Defossez. 2003. Immunolocalization of inhibin and activin  $\alpha$  and  $\beta$  subunit and expression of corresponding messenger RNAs in the human adult testis. **Biol. Reprod**. 68:230-235.
- Matthiesson, K.L. and R.I. McLachlan. 2006. Male hormonal contraception: Concept proven, product in sight? **Hum. Reprod. Update**. 12:463-482.
- Nantel, F., L. Monaco, N.S. Foulkes, D. Masquillier, M. LeMeur, K. Hendriksen, A. Dierich, M. Parvinen, and P. Sassone-Corsi. 1996. Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis CREM-mutant mice. **Nature**. 380:159-162.
- Ohta, T., H. Miyake, C. Miura, H. Kamei, K. Aida, and T. Miura. 2007. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. **Biol. Reprod**. 77:970-977.
- Peri, A. and M. Serio. 2000. The CREM system in human spermatogenesis. **J. Endocrinol. Investigation**. 23:578-583.
- Raivio, T., S. Sanna, J. Jarmo, K. Jorma, and D. Leo. 2000. Signaling between the pituitary gland and the testes: Inverse relationship between serum FSH and inhibin B concentrations in boys in early puberty. **European J. Endocrinol**. 142:150-156.
- Sambrovi, E., D.R. Antoine, L. Jean-Jacques, and L.G. Florence. 2013. FSH and LH have common and distinct effects on gene expression in rainbow trout testis. **J. Mol. Endocrinol**. 50:1-18.
- Sassone-Corsi, P. 2000. CREM: A master-switch regulating the balance between differentiation and apoptosis in the male germ cells. **Mol. Reprod. Dev**. 56:228-229.
- Steger, K., T. Klönisch, K. Gavenis, R. Behr, V. Schaller, B. Drabent, D. Doenecke, E. Nieschlag, M. Bergmann, and G.F. Weinbauer. 1999. Round spermatids show normal testis-specific Hit but reduced cAMP-responsive element modulator and transition protein 1 expression in men with round spermatid maturation arrest. **J. Androl**. 20:747-754.

- Sutcliffe, A., A.S. Helen., N. Devaki, B. Pierre., O. Tim, S. Philip, B. Wendy, B.L. Cornelis, and S. Tim. 2006. Comparison of serum FSH and inhibin B levels between adult male dizygotic and monozygotic twins. **Human Reprod.** 21(2): 447-450.
- Tanaka, H., Y. Miyagawa, A. Tsujimura, K. Matsumiya, A. Okuyama, and Y. Nishimune. 2003. Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile human male populations. **Mol. Hum. Reprod.** 9(2):69-73.
- United Nations Population Division. 2000. **World Population Prospects: The 2000 Revision**. United Nations, New York.
- Walker, W. and J. Cheng. 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reprod.** 130:15-28.
- Weinbauer, G.F., R. Behr, M. Bergman, and E. Nieschlag. 1998. Testicular cAMP responsive element modulator (CREM) protein is expressed in round spermatids but is absent or reduced in men with round spermatid maturation arrest. **Mol. Hum. Reprod.** 4:9-15.
- World Health Organization. 1998. Task force on post-ovulatory methods for fertility regulation. Randomised and controlled trial of levonorgestrel versus the Yuzpe regimen of combined oral contraceptives for emergency contraception. **Lancet.** 352:428-433.