

Polimorfisme Gen Reseptor FSH pada Pria Normozoospermia dan Azoospermia¹

BKS
SEM

Oleh:
Dr. Yuni Ahda, M.Si.²

UNIVERSITAS PADJARAN
11 Juni 2012
Hd
L1
97(Hd 2012 - p. 1 (1)
574. 873 22 Ahda p. 1

¹Disampaikan pada Seminar Nasional dan Rapat Tahunan (Semirata) BKS PTN MIPA Wilayah Barat & MIPAnet Tahun 2006 di Padang, 9 – 11 Juli 2006

²Staf Pengajar Jurusan Biologi FMIPA UNP.

MILIK PERPUSTAKAAN
UNIV. NEGERI PADANG

Polimorfisme Gen Reseptor FSH pada Pria Normozoospermia dan Azoospermia

Yuni Ahda^{1,2}

¹Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Padang, ²Institute of Reproductive Medicine, Muenster University Hospital, Muenster, Germany.

Abstrak

Gen reseptor *follicle-stimulating hormone* (FSHR) manusia memiliki *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) pada ekson 10. SNP tersebut mempengaruhi level serum FSH pada wanita namun tidak memberikan pengaruh pada pria. Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian kami sebelumnya dan untuk pertama kalinya menganalisis SNP baru pada posisi -29 dari promoter inti gen RFSH pria. SNP pada kodon 680 dianalisis pada 438 pria azoospermia yang bukan disebabkan oleh penyumbatan saluran reproduksi (non-obstruksi) dan pada 304 pria normal (kontrol). SNP pada kodon 307 dan pada posisi -29 dianalisis pada 345 pria azoospermia non-obstruksi dan pada 186 kontrol. SNP dianalisis menggunakan metoda diskriminasi alel. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada frekuensi polimorfisme posisi 680 dan level serum FSH levels. Frekuensi polimorfisme pada posisi -29 (A/G) alel A⁻²⁹ lebih kecil dibanding alel G⁻²⁹. Kondisi ini dijumpai baik pada kontrol (25% vs. 75%) maupun pada pasien (30% vs. 70%) ($p = NS$). Hasil analisis haplotip untuk ketiga SNP menunjukkan terjadinya 10 kombinasi. Terdapat perbedaan signifikan pada distribusi alel antara kontrol dan pria azoospermia ($p < 0.05$ by χ square test). Alel A-Ala-Ser ditemukan dalam frekuensi yang lebih besar pada pasien (9.1%) dibanding pada kontrol (5.4%), sedangkan alel G-Thr-Asn ditemukan dalam frekuensi yang lebih kecil pada pasien (33.1%) dibanding pada kontrol (40.6%) ($p < 0.01$ by Fisher's exact test). Tidak terdapat korelasi antara level serum FSH dan alel FSHR. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa haplotip reseptor FSH tidak ada kaitannya dengan perbedaan level serum FSH tetapi terjadi perbedaan distribusi haplotip pada pria normal and azoospermia. Diduga alel A-Ala-Ser dan G-Thr-Asn membawa faktor genetik yang berkontribusi terhadap ekspresi fenotip pada pasien dengan kegagalan spermatogenesis berat.

Kata kunci: infertilitas pria, polimorfisme, SNP, testis, azoospermia

Pendahuluan

Folikel stimulating hormon (FSH) merupakan hormon utama yang bertanggung jawab untuk aktivitas sel Sertoli dan sel granulosa dan untuk gametogenesis. FSH menginduksi spermatogenesis dan pertumbuhan sel-sel folikel melalui reseptor spesifiknya (FSHR). Gen reseptor FSH terdiri dari 10 ekson dan 9 intron. Aktivitas dari gen ini dikendalikan oleh promoter inti yang berukuran 225 pb dengan ciri khasnya tidak mempunyai sekuens TATA (Gromoll *et al.*, 1994).

Hasil skrining mutasi gen reseptor FSH menunjukkan bahwa baik daerah promoter maupun *coding region* merupakan daerah yang polimorfik. Pada daerah promoter ditemukan satu *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) pada posisi -29 (G → A) dengan frekuensi yang cukup tinggi (Simoni *et al.*, 2002). Sementara itu pada ekson 10 ditemukan dua polimorfisme yaitu pada posisi 919 dan 2039 (Simoni *et al.*, 1999). Kedua SNPs tersebut menghasilkan dua variasi alel utama pada populasi Caucasia yaitu Thr³⁰⁷-Asn⁶⁸⁰ dan Ala³⁰⁷-Ser⁶⁸⁰ (Simoni *et al.*, 1999; Simoni *et al.*, 2002). Penelitian mengenai distribusi kedua varian tersebut pada pasien infertil maupun orang normal sudah banyak dilakukan dengan hasil yang bervariasi. Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa tidak ditemukan perbedaan distribusi varian pada pasien infertil dan orang normal (Simoni *et al.*, 1999; Conway *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1998), sebaliknya pada beberapa penelitian lain ditemukan perbedaan distribusi yang signifikan antara pasien infertil dan orang normal (Sudo *et al.*, 2002; Laven *et al.*, 2003). Hasil ini menimbulkan suatu pemikiran bahwa kemungkinan distribusi varian dipengaruhi oleh etnis.

Polimorfisme RFSH posisi 2039 (kodon 680) mempengaruhi level serum FSH dan sensitivitas RFSH terhadap stimulasi secara *in vivo*. Hasil penelitian pada wanita-wanita yang menjalani program IVF/ICSI menunjukkan bahwa level FSH basal dan dosis FSH untuk stimulasi ovarium ditentukan oleh genotip RFSH. Wanita-wanita dengan genotip homozigot Ser/Ser mempunyai level FSH yang lebih tinggi dan membutuhkan dosis FSH yang lebih besar dibanding wanita dengan genotip homozigot Asn/Asn (Perez-Mayorga *et al.*, 2000; de Castro *et al.*, 2003). Namun, polimorfisme posisi 680 tidak memperlihatkan pengaruh pada level serum FSH dan parameter-parameter klinis lainnya pada laki-laki normal maupun infertil (Simoni *et al.*, 1999; Asatiani *et al.*, 2002). Saat ini belum diketahui penyebab perbedaan pengaruh di antara kedua gender tersebut. Namun, kami menduga bahwa salah satu penyebab tidak ditemukannya pengaruh genotip pada laki-laki infertil dan normal yang sudah diteliti sebelumnya adalah ketidakhomogenan sampel laki-laki infertil yang diteliti atau juga jumlah sampel yang kurang banyak. Namun, pengaruh klinis dari polimorfisme promoter (posisi -29) baik sendiri maupun bersama-sama dengan polimorfisme gen struktur (posisi 680) sampai saat ini belum diketahui. Oleh karena itu, dalam penelitian ini, untuk pertama kalinya kami ingin

melihat distribusi polimorfisme posisi -29 baik sendiri maupun bersama-sama dengan polimorfisme posisi 680 pada laki-laki non-obstructive azoospermia dan laki-laki normal. Selanjutnya kami juga ingin melanjutkan penelitian kami sebelumnya untuk melihat hubungan polimorfisme posisi 680 dengan level serum FSH karena kami menduga bahwa tidak adanya korelasi antara keduanya kemungkinan karena adanya efek menghambat dari spermatogenesis yang menyebabkan terjadinya variasi level serum inhibin B yang selanjutnya menutupi hubungan antara serum FSH dan genotip.

Bahan dan Metoda

Penelitian dilakukan di Institute of Reproductive Medicine, University Clinics of Muenster, Germany. Penelitian dilakukan pada 304 laki-laki normal (semen normal berdasarkan kriteria WHO; level serum FSH < 7 IU/l) dan 438 laki-laki infertil (non-obstructive azoospermia; level serum FSH \geq 7 IU/l). Kriteria eksklusi: laki-laki hypogonadotropic hypogonadism dan penderita penyakit-penyakit genetik yang menyebabkan azoospermia seperti sindrom Klinefelter atau delesi kromosom Y). Semua subjek merupakan ras Kaukasia. Semua subjek memberikan inform concern yang disahkan oleh komite etik Fakultas kedokteran.

Analisis SNPs posisi -29 , 919 (kodon 307) dan 2039 (kodon 680)

DNA genom diekstrak dari darah tepi menggunakan kit FlexiGene DNA extraction (Qiagen, Germany) berdasarkan manual yang disediakan perusahaan. Analisis SNPs pada ketiga posisi dilakukan dengan asay alel diskriminasi menggunakan mesin TaqMan (ABI Prism 7000 sequence detection system, Applied Biosystem, Germany). Reaksi PCR (25 μ l) terdiri dari 2 μ l DEPC treated water, 12,5 μ l Universal master mix, 0,25 μ l probe, dan 4,5 μ l primer (5 pmol). Daftar primer dan probe yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Analisis SNPs dengan mesin TaqMan dilakukan dalam dua tahap, yaitu kuantifikasi absolut dan diskriminasi alel. Untuk kuantifikasi absolut siklusnya adalah: stage 1: 50°C, 2 menit (1 siklus) untuk penempelan probe; stage 2: denaturasi pada 95°C, 10 menit (1 siklus) dan diikuti dengan 35 siklus pada 95°C selama 15 detik dan 60°C

selama 1 menit (stage 3); sedangkan untuk diskriminasi alel hanya membutuhkan waktu 1 menit pada suhu 60°C.

Tabel 1. Probe yang digunakan dalam asay diskriminasi menggunakan TaqMan

Jenis probe	Sekuens probe	Tipe fluoresens
680-G	5'-AGAGTCACCA g TGGTT-3'	(FAM fluorescence)
680-A	5'-AGTCACCA a TGGTTC-3'	(VIC fluorescence)
307-G	5'-TTATATGACTCAG g CTAGG-3'	(VIC fluorescence)
307-A	5'-ATTATATGACTCAG a CTAGG-3'	(FAM fluorescence)
-29-G	5'-TGCAAATGCAG g AAG-3'	(FAM fluorescence)
-29-A	5'-TGCAAATGCAG a AAG-3'	(VIC fluorescence)

Tabel 2. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen RFSH menggunakan TaqMan

Type of primers	Sequence of primers
680 forward	5' -AAGGAATGGCCACTGCTCTTC-3'
680 reverse	5'-GGGCTAAATGACTTAGAGGGACAA-3'
307 forward	5'-CTTCATCCAATT TGCAACAAATCTAT-3'
307 reverse	5'-TGTCTTCTGCCAGAGAGGATCTC-3'
-29 forward	5'-AGCTTCTGAGATCTGTGGAGGTTT-3'
-29 reverse	5'-AATTATGCATCCATC CA CCTGATT-3'

Analisis statistik

Analisis statistik dilakukan menggunakan paket software GraphPad Prism, GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). Pertama dilakukan analisis distribusi normal data. Data ditampilkan sebagai rata-rata \pm SEM. Data dianalisis menggunakan Anova satu arah, Kruskal-Wallis dan χ square. Bila nilai $p \leq 0,05$ maka didapatkan perbedaan yang signifikan.

Hasil

SNPs pada posisi 2039 (kodon 680, ekson 10)

Skrining polimorfisme pada posisi 680 pada 304 menunjukkan hasil 33,2% (Asn/Asn), 47% (Asn/Ser) dan 19,8% (Ser/Ser) pada laki-laki normal dan 28,8% (Asn/Asn), 49,3%

574 073 22
 Alu
 p: 1

azoospermia menunjukkan linkage antara SNP posisi 680 dan 307 yang menghasilkan kombinasi asam amino Thr³⁰⁷-Asn⁶⁸⁰ dan Ala³⁰⁷-Ser⁶⁸⁰. Analisis haplotip yang mengikutsertakan polimorfisme posisi -29 menghasilkan empat variasi alel utama yaitu:

Tabel 3. Kombinasi alel yang melibatkan ketiga polimorfisme gen reseptor FSH, distribusi genotip dan level serum FSH (mean ± SE) pada pria normozoospermia

Group	Allele combination (-29/307/680)	Frequency % (n)	FSH (IU/l)
1	A-Thr-Asn/A-Thr-Asn	1.6 (3)	2.6±0.1
2	A-Thr-Asn/A-Ala-Ser	2.7 (5)	2.7±0.8
3	A-Ala-Ser/A-Ala-Ser	1.1 (2)	3.2±2.1
4	A-Thr-Asn/G-Thr-Asn	16.7 (31)	2.8±1.1
5	A-Thr-Asn/G-Ala-Ser or* G-Thr-Asn/A-Ala-Ser	17.2 (32)	3.1±1.2
6	A-Ala-Ser/G-Ala-Ser	5.9 (11)	3.2±1.5
7	G-Thr-Asn/G-Thr-Asn	21.5 (40)	3.2±1.3
8	G-Thr-Asn/G-Ala-Ser	21.5 (40)	2.9±1.2
9	G-Ala-Ser/G-Ala-Ser	11.8 (22)	3.0±1.2

* not possible to discriminate between the two possible allele combinations

Tabel 4. Kombinasi alel yang melibatkan ketiga polimorfisme gen reseptor FSH, distribusi genotip dan level serum FSH (mean ± SE) pada pria azoospermia

Group	Allele combination (-29/307/680)	Frequency % (n)	FSH (IU/l)
1	A-Thr-Asn/A-Thr-Asn	2.4 (8)	21.5 ± 3.0
2	A-Thr-Asn/A-Ala-Ser	3.8 (13)	22.6 ± 2.0
3	A-Ala-Ser/A-Ala-Ser	1.8 (6)	17.3 ± 4.4
4	A-Thr-Asn/G-Thr-Asn	12.6 (43)	20.9 ± 1.5
5	A-Thr-Asn/G-Ala-Ser or* G-Thr-Asn/A-Ala-Ser	20.5 (70)	19.3 ± 1.2
6	A-Ala-Ser/G-Ala-Ser	10.8 (37)	20.8 ± 1.6
7	G-Thr-Asn/G-Thr-Asn	14.7 (50)	20.3 ± 1.2
8	G-Thr-Asn/G-Ala-Ser	24.3 (83)	19.2 ± 1.2
9	G-Ala-Ser/G-Ala-Ser	9.1 (31)	24.5 ± 2.3

• *not possible to discriminate between the two possible allele combinations

A⁻²⁹-A⁹¹⁹-A²⁰³⁹ (A-Thr-Asn), G⁻²⁹-A⁹¹⁹-A²⁰³⁹ (G-Thr-Asn), A⁻²⁹-G⁹¹⁹-G²⁰³⁹ (A-Ala-Ser) dan G⁻²⁹-G⁹¹⁹-G²⁰³⁹ (G-Ala-Ser). Berdasarkan hasil penelitian kami distribusi kombinasi keempat haplotip di atas tercatat sebesar 99% pada populasi Kaukasia. Haplotip tersebut terkombinasi ke dalam 10 kombinasi utama (Tabel 3 dan Tabel 4). Tidak ada perbedaan yang signifikan pada level FSH di antara genotip reseptor FSH, baik pada kontrol maupun pasien (Tabel 3 dan Tabel 4). Tidak terdapat perbedaan distribusi genotip di antara kontrol dan pasien ($p > 0,05$, χ square test). Namun ketika dilakukan penghitungan frekuensi keseluruhan dari empat variasi alel reseptor FSH pada kontrol dan pasien azoospermia didapatkan perbedaan yang signifikan di antara kedua kelompok sampel ($p < 0,05$, χ square test) (Tabel 5). Hasil test posteriori Fisher's exact yang membandingkan suatu alel dengan alel yang lain menunjukkan bahwa variasi alel A-Ala-Ser dan G-Thr-Asn berbeda secara signifikan antara kelompok kontrol dan pasien ($p < 0,01$).

Tabel 5. Frekuensi alel pada laki-laki normozoospermia dan non-obstructive azoospermia

Allele (-29-307-680)	Normozoospermia		Azoospermia	
	%	(n)	%	(n)
1. A-Thr-Asn	11.3	(42)	10.6	(72)
2. A-Ala-Ser [§]	5.4	(20)	9.1	(62)
3. G-Thr-Asn [§]	40.6	(151)	33.1	(226)
4. G-Ala-Ser	25.5	(95)	26.7	(182)
5. undecided*	17.2	(64)	20.5	(140)

- Kelompok 5 terdiri dari alel 1, 2, 3 dan 4 yang tidak bisa dibedakan dan dimasukkan dalam analisis statistik sebagai variabel "dummy"
- [§] $p < 0.01$ dengan tes Fisher's exact

Diskusi

Pada wanita dengan fungsi ovarium normal, polimorfisme pada kodon 680 gen reseptor FSH merupakan penentu yang penting dalam melihat sensitivitas reseptor terhadap FSH (Perez-Mayorga *et al.*, 2000; Sudo *et al.*, 2002; de Castro *et al.*, 2003; de Castro *et al.*, 2004). Reseptor dengan genotip Ser/Ser terlihat kurang sensitive terhadap stimulasi FSH dan wanita-wanita dengan genotip ini mempunyai level serum FSH yang lebih tinggi pada fase folikular dari siklus menstruasi dibanding wanita dengan genotip

Asn/Asn. Namun perbedaan respon tersebut tidak terlihat pada laki-laki, baik laki-laki normal maupun laki-laki dengan gangguan spermatogenesis (Simoni *et al.*, 1999; Asatiani *et al.*, 2002; penelitian ini). Belum diketahui alasan dari perbedaan respon ini tetapi kemungkinan ada kaitannya dengan perbedaan kontrol sekresi FSH di antara kedua gender. Pada siklus ovarium, induksi aromatase pada sel-sel granulosa yang tergantung pada FSH menyebabkan meningkatnya level serum estrogen yang kemudian akan menekan sekresi FSH dan menyebabkan berhentinya perkembangan folikel berikutnya, sedangkan induksi reseptor LH menghasilkan folikel dominan dengan kemampuan dapat berespon terhadap LH dan mencegahnya terhadap efek negatif dari penurunan konsentrasi FSH (Zelevnik, 2001). Inhibin B merupakan produk dari folikel yang pertumbuhannya sedang mencapai puncak dan berkontribusi terhadap penekanan sekresi FSH pada fase mid-folikel, sedangkan inhibin A dihasilkan bila folikel dominan telah mencapai ukuran maksimal pada fase luteal (Lockwood *et al.*, 1998).

Kedua sistem ini yang berdasarkan pada dua inhibin yaitu A dan B, tidak dijumpai pada laki-laki. Pada laki-laki, sekresi FSH tidak siklik dan pengaturan balik terhadap FSH dikontrol oleh testosteron/estradiol dan oleh inhibin B dan kemungkinan tergantung pada proliferasi spermatogonia (Foppiani *et al.*, 1999). Pada penelitian ini kami dapat menunjukkan dalam sampel pasien non-obstructive yang berukuran besar bahwa level serum FSH tidak dipengaruhi oleh polimorfisme posisi 680, walaupun laki-laki bergenotip Ser/Ser menunjukkan kecenderungan punya level FSH yang lebih tinggi.

Tidak adanya korelasi antara genotip reseptor FSH dan level serum FSH pada laki-laki kemungkinan dapat dijelaskan oleh sekurang-kurangnya dua alasan. Pertama, inhibin A, yang tidak ada pada laki-laki, mungkin merupakan factor kunci dalam menentukan kaitannya dengan perempuan. Yang kedua, proliferasi spermatogonium merupakan suatu proses yang terus menerus berlangsung, berlawanan dengan wanita yang mempunyai siklus atretik, sehingga sel-sel penghasil inhibin B pada kedua gender benar-benar berbeda baik pada dinamika pertumbuhan maupun diferensiasi. Produksi inhibin B yang terus menerus pada laki-laki kemungkinan menghambat sekresi FSH secara terus menerus. Pada penelitian ini kami tidak mengukur level inhibin B, tetapi kami menyeleksi pasien-pasien yang mempunyai level FSH tinggi, diasumsikan bahwa mereka mereduksi konsentrasi inhibin B (von Eckardstein *et al.*, 1999).

Pada penelitian ini data kami menunjukkan bahwa empat haplotip yang paling umum, yang dihasilkan dari SNP promoter dan SNPs coding region, tidak ada hubungannya dengan level serum FSH baik pada kontrol maupun pasien, tetapi terdistribusi secara berbeda. Kami menduga ada faktor genetis lain yang kemungkinan berkontribusi pada kejadian infertilitas pada pria.

Daftar Pustaka

- Asatiani K, Gromoll J, Eckardstein SV, Zitzmann M, Nieschlag E, Simoni M (2002) Distribution and function of FSH receptor genetic variants in normal men. *Andrologia* 34,172-176.
- Bergmann M, Behre HM, Nieschlag E (1994) Serum FSH and testicular morphology in male infertility. *Clin Endocrinol (Oxf)* 40,133-136.
- Conway GS, Conway E, Walker C, Hoppner W, Gromoll J, Simoni M (1999) Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 51,97-99.
- de Castro F, Moron FJ, Montoro L, Galan JJ, Hernandez DP, Padilla ES, Ramirez-Lorca R, Real LM, Ruiz A (2004) Human controlled ovarian hyperstimulation outcome is a polygenic trait. *Pharmacogenetics* 14,285-293.
- de Castro F, Ruiz R, Montoro L, Perez-Hernandez D, Sanche Z, Cases Padilla E, Real LM, Ruiz A (2003) Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 80,571-576.
- Foppiani L, Schlatt S, Simoni M, Weinbauer GF, Hacker-Klom U, Nieschlag E (1999) Inhibin B is a more sensitive marker of spermatogenetic damage than FSH in the irradiated non-human primate model. *J Endocrinol* 162:393-400.
- Gromoll J, Dankbar B, Gudermann T (1994) Characterization of the 5' flanking region of the human follicle-stimulating hormone receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 102,93-102.

- Laven JSE, Mulders AGMGJ, Suryandari DA, Gromoll J, Nieschlag E, Fauser BCJM, Simoni M (2003) Follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms in women with normogonadotropic anovulatory infertility. *Fertil Steril* 80:986-992.
- Liu JY, Gromoll J, Cedars MI, La Barbera AR (1998) Identification of allelic variants in the follicle-stimulating hormone receptor genes of females with or without hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil Steril* 70:326-331.
- Lockwood GM, Muttukrishna S, Ledger WL (1998) Inhibins and activins in human ovulation, conception and pregnancy. *Hum Reprod Update* 4:284-295.
- Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M (2001) Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *Eur J Endocrinol* 145:561-571.
- Perez-Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M (2000) Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3365-3369.
- Simoni M, Gromoll J, Höppner W, Kamischke A, Krafft T, Stähle D, Nieschlag E (1999) Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: Identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocrinol Metab* 84:751-755.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E (1997) The follicle-stimulating hormone receptor: Biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 18:739-773.
- Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J (2002) Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Reprod Update* 8:413-421.
- Sudo S, Kudo M, Wada S, Sato O, Hsueh AJ, Fujimoto S (2002) Genetic and functional analysis of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Mol Hum Reprod* 8:893-899.
- von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG, Nieschlag E (1999) Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab*. 84:2496-2501.

WHO (1999) Laboratory manual for the examination of the human semen and sper-
cervical mucus interaction. 4th edn, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Zeleznik AJ (2001). Follicle selection in primates: "many are called but few are chosen".

Biol Reprod. 65:655-659

07 (Hd) 2012 - p. 1 (L)

MILIK PERPUSTAKAAN
UNIV. NEGERI PADANG