

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO DE LA INHIBINA B EN EL HIPOGONADISMO  
HIPOGONADOTRÓPICO INDUCIDO POR EL BLOQUEO  
ANDROGÉNICO EN PACIENTES CON  
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Alfonso Diego García

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-2060-9**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Medicina  
Cátedra de Urología**

**ESTUDIO DE LA INHIBINA B EN EL HIPOGONADISMO  
HIPOGONADOTROPICO INDUCIDO POR BLOQUEO  
ANDROGENICO EN PACIENTES CON  
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA**

**TESIS DOCTORAL**

**D. Alfonso Diego García**

**MADRID. 2001**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Medicina  
Cátedra de Urología**

**ESTUDIO DE LA INHIBINA B EN EL HIPOGONADISMO  
HIPOGONADOTROPICO INDUCIDO POR BLOQUEO  
ANDROGENICO EN PACIENTES CON  
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA**

**TESIS DOCTORAL**

**DIRECTOR: PROFESOR D. LUIS RESEL ESTÉVEZ**

**CO-DIRECTOR: DR. JESUS MORENO SIERRA**

**MADRID. 31 de julio de 2001**



<b>UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID</b> .....	1
TESIS DOCTORAL.....	1
D. Alfonso Diego García.....	1
MADRID. 2001.....	1
<b>UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID</b> .....	2
TESIS DOCTORAL.....	2
DIRECTOR: PROFESOR D. LUIS RESEL ESTÉVEZ.....	2
CO-DIRECTOR: DR. JESUS MORENO SIERRA.....	2
MADRID. 31 de julio de 2001.....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>DEFINICION, ESTRUCTURA Y CLASIFICACION DE LA INHIBINA</b> .....	2
<b>DISTRIBUCION TISULAR</b> .....	4
<b>DETERMINACION DE LA INHIBINA</b> .....	6
<b>FISIOLOGIA DE LA INHIBINA</b> .....	15
<b>POSIBLES APLICACIONES CLINICAS DE LA INHIBINA B EN EL HOMBRE</b> .....	26
<b>SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO</b> .....	28
<b>HORMONAS DEL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO.-</b> .....	28
Gonadotropinas, esteroides y sus sitios de síntesis. Producción de gonadotropinas.- .....	28
Transformación de la señal FSH/LH.-.....	29
Sitios de acción de las gonadotropinas.-.....	30
<b>RELACION ENTRE LAS HORMONAS DEL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO.-</b> .....	31
<b>HIPOGONADISMOS EN EL VARON</b> .....	34
Definición y Clasificación.-.....	34
<b>HIPOGONADISMOS HIPOGONADOTROPICOS</b> .....	36
<b>AGONISTAS LHRH y ANTIANDRÓGENOS EN CANCER DE PROSTATA: CONSIDERACIONES BASICAS</b> .....	38
<b>TRATAMIENTO CON AGONISTAS LHRH</b> .....	45
<b>HORMONORRESISTENCIA</b> .....	50
<b>HIPOTESIS</b> .....	56
<b>OBJETIVOS</b> .....	59
Objetivo general.-.....	60
Objetivos específicos.- .....	60
<b>MATERIAL Y METODOS</b> .....	62
<b>Diseño y Metodología</b> .....	63
Población de estudio diana: .....	63
Población de estudio muestreado: .....	63
Tamaño muestral .....	64
Cuaderno de recogida de datos y Definición de variables.....	64
Datos de filiación:.....	65
Nombre y apellidos, Nº Historia Clínica Hospital General de Segovia, Edad, Fecha de nacimiento y Fecha del estudio. ....	65
Historia clínica: .....	65
Normativa ética para la Investigación .....	68
Consentimiento informado para pacientes participantes en el estudio .....	68
<b>Determinaciones séricas:</b> .....	70
Determinaciones bioquímicas: .....	71
Determinaciones Hormonales.....	71
<b>Determinaciones hormonales por técnica ECLIA.</b> .....	72
<b>Ensayo FSH-Hormona Foliculoestimulante</b> .....	74
Función.-.....	74

Test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de la hormona foliculoestimulante en suero y plasma humanos.....	74
Características.- .....	74
Principio del test.-.....	75
Reactivos, contenido y concentraciones.-.....	75
Obtención y preparación de las muestras.- .....	76
FSH Elecsys Procedimiento.- .....	76
Calibradores.- .....	77
Cálculo.- .....	78
Limitaciones del análisis - interferencias - .....	78
Intervalo de medición.-.....	79
Dilución de las muestras.- .....	79
Intervalo de referencia en varones -.....	79
Características del test. ....	80
<b>1.1 Ensayo LH-Hormona Luteinizante.....</b>	<b>82</b>
Función.-.....	82
Características.- .....	82
Principio del test.-.....	83
Reactivos - contenido y concentraciones.- .....	83
Obtención y preparación de las muestras.- .....	83
LH Elecsys Procedimiento.- .....	84
Calibradores.- .....	85
Cálculo.- .....	85
Limitaciones del análisis - interferencias - .....	86
Intervalo de medición.-.....	86
Dilución de las muestras.- .....	87
Intervalo de referencia en varones -.....	87
Características del test. ....	87
<b>ENSAYO PROLACTINA.....</b>	<b>89</b>
Función.....	89
Características .....	89
Principio del test.....	90
Reactivos - contenido y concentraciones.....	90
Obtención y preparación de las muestras .....	90
Prolactina Elecsys Procedimiento .....	91
Calibradores.....	92
Cálculo .....	92
Limitaciones del análisis - interferencias .....	93
Intervalo de medición.....	94
Dilución de las muestras.....	95
Intervalo de referencia en varones.....	95
Características del test. ....	95
Comparación de métodos .....	97
<b>ENSAYO ESTRADIOL E2 .....</b>	<b>97</b>
Función.....	97
Características .....	98
Principio del test.....	98
Reactivos - contenido y concentraciones.....	99
Obtención y preparación de las muestras .....	100
Estradiol Elecsys Procedimiento .....	100
Calibradores.....	101
Cálculo .....	102
Limitaciones del análisis - interferencias .....	102
Intervalo de medición.....	103
Dilución de las muestras.....	103
Intervalo de referencia en varones.....	104
Características del test. ....	104
Comparación de métodos .....	105
<b>ENSAYO TESTOSTERONA .....</b>	<b>106</b>
Función.....	106

Características .....	106
Principio del test .....	107
Reactivos - contenido y concentraciones .....	108
Obtención y preparación de las muestras .....	108
Testosterona Elecsys Procedimiento .....	109
Calibradores.....	110
Cálculo .....	110
Limitaciones del análisis - interferencias .....	111
Intervalo de medición .....	111
Dilución de las muestras.....	112
Intervalo de referencia en varones.....	112
Características del test.....	112
Comparación de métodos .....	114
<b>ENSAYO TIROTROPINA-TSH .....</b>	<b>114</b>
Función.....	114
Características .....	114
Comparación de métodos .....	116
<b>ENSAYO INHIBINA B.....</b>	<b>117</b>
Anticuerpos monoclonales.....	117
Standard de Inhibina B.....	118
Procedimiento ELISA para Inhibina B.....	119
Representación del ensayo.....	121
<b>Análisis Estadístico .....</b>	<b>138</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>140</b>
<b>Características de la población .....</b>	<b>141</b>
Características de la población del Grupo I.....	142
Características de la población del grupo II .....	145
<b>Tratamiento antiandrogénico Grupo II .....</b>	<b>150</b>
<b>Nivel Inhibina B y Razón Inhibina B/FSH.....</b>	<b>152</b>
<b>Determinaciones hormonales .....</b>	<b>155</b>
<b>Determinaciones hormonales .....</b>	<b>156</b>
Grupo II.....	157
Grupo I .....	157
<b>Correlación inhibina B y razón inhibina B/FSH con hormonas centrales y periféricas .....</b>	<b>159</b>
<b>Correlación inhibina B y razón inhibina B/FSH con exploración genital y determinaciones bioquímicas .....</b>	<b>171</b>
Grupo II.....	171
Grupo I .....	173
<b>Efecto de gonadotóxicos, fármacos y enfermedad sistémica en niveles hormonales .....</b>	<b>175</b>
<b>Validez de la Inhibina B .....</b>	<b>176</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>210</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>212</b>

# **INTRODUCCIÓN**



## DEFINICION, ESTRUCTURA Y CLASIFICACION DE LA INHIBINA

La inhibina es una hormona glicoproteica que inhibe la producción y/o secreción de las gonadotropinas pituitarias, preferentemente FSH <sup>1</sup> **Figura 1**. Forma parte de un grupo de tres factores polipeptídicos no esteroides, con influencias regulatorias, más selectivas de la secreción pituitaria de FSH, que son la inhibina, activina y folistatina. Como es sugerido por sus nombres, la inhibina descende y la activina estimula la función gonadotropa. La folistatina, inicialmente llamada "proteína supresora de la FSH" también inhibe la expresión del gen FSH-beta, pero aproximadamente a un tercio de la potencia de la inhibina <sup>2,3,4,5</sup> .

La inhibina y la activina son peptidos estrechamente relacionados cuya estructura ha sido determinada recientemente por técnicas de clonación y química proteica <sup>6,7</sup> .

La inhibina comprende una alfa-subunidad (masa molecular relativa Mr = 18 Kd) unida por un puente disulfuro a una de dos beta-subunidades altamente homólogas (aproximadamente Mr = 14 Kd) para formar tanto inhibina A (alfa-betaA) ó inhibina B (alfa-betaB) **Figura 2** .

La activina está compuesta de homodímeros ó heterodímeros de las mismas beta-subunidades, resultando en Activina-A (betaA-betaA), activina AB (betaA-betaB) ó activina B (betaB-betaB) <sup>8,9</sup> . Los nueve residuos de cisteína presentes en la subunbidad betaA madura son esenciales para la formación del homodímero y la obligatoria alta afinidad del receptor<sup>10</sup> .

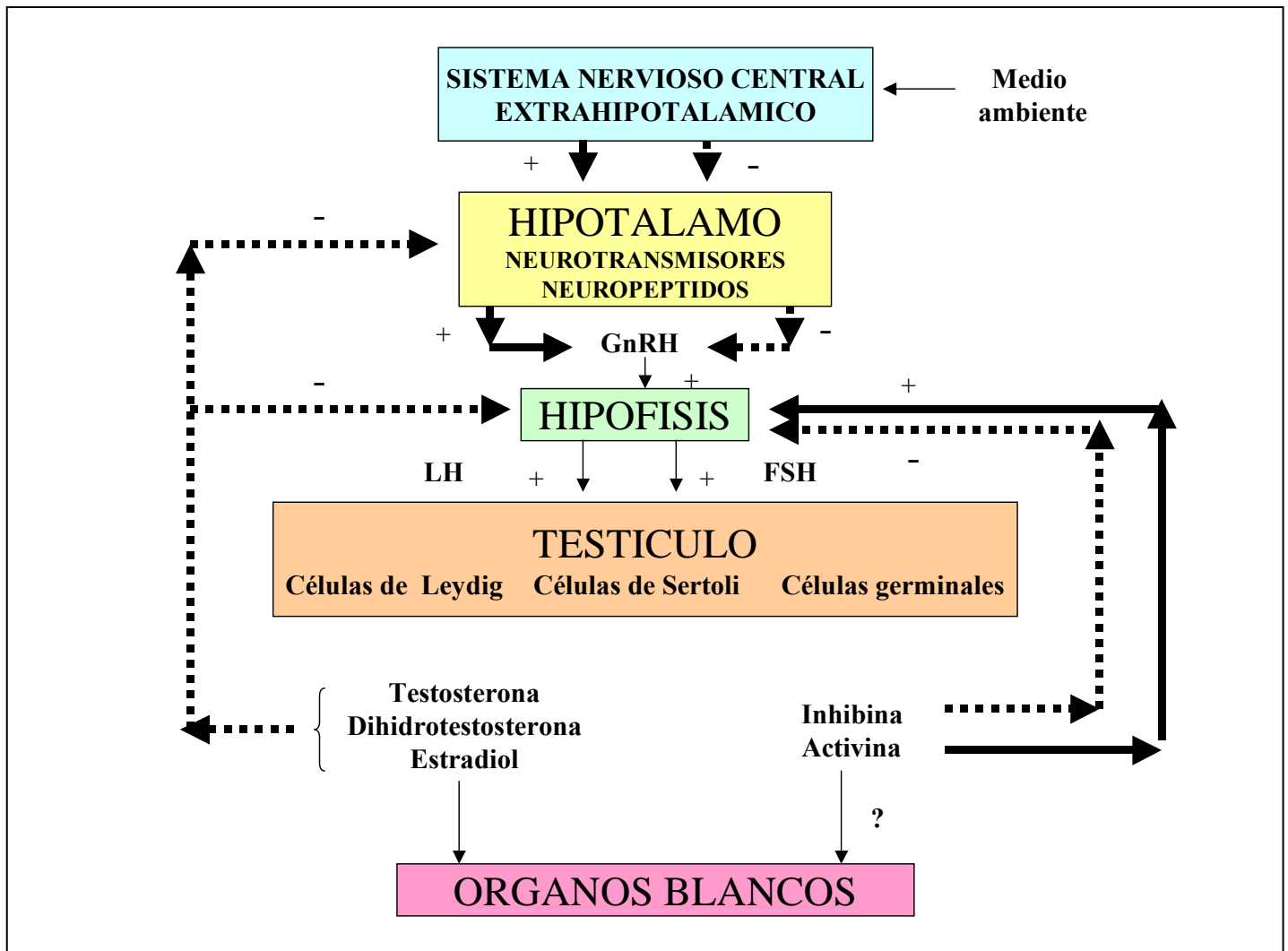


Figura 1: EJE HIPOTALAMO-HIPOFISARIO-TESTICULAR. GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas. LH: Hormona Luteinizante. FSH: Hormona foliculoestimulante. +: activación. -: inhibición

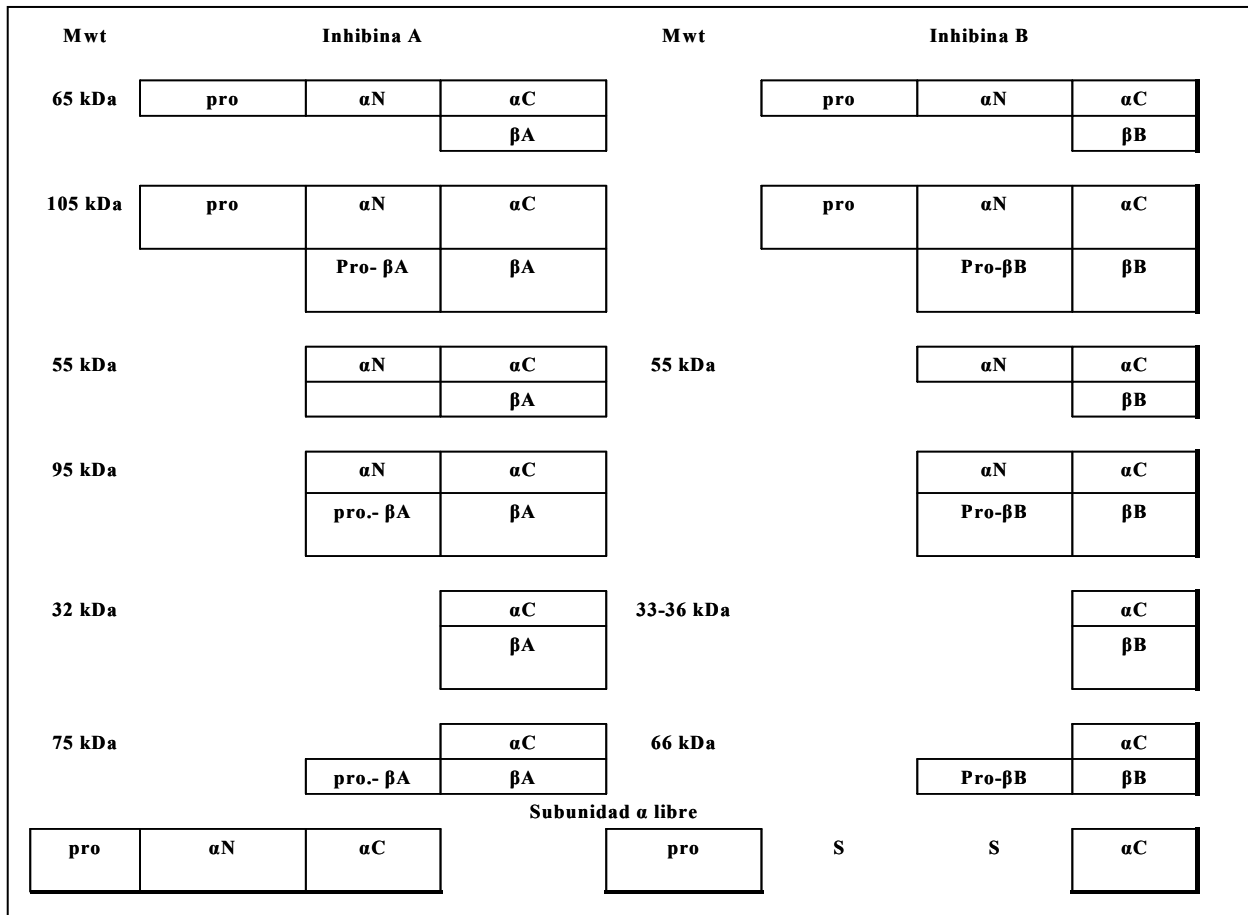
Dada la estructura basada en la subunidad beta, la activina ha sido determinado que pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TG F beta). Este grupo de factores de crecimiento y diferenciación incluye TGF beta, sustancia inhibidora Mulleriana (MIS), proteínas morfogénicas del hueso y la proteína anfibia VG-1 (importante durante la embriogénesis) <sup>2,3,8,9</sup> .

Las subunidades alfa y beta son sintetizadas como proproteinas (pro alfaN-alfaC y pro beta-beta. **Figura 2** <sup>11</sup> .

La folistatina es estructuralmente no relacionada con las subunidades de activina e inhibina. Consta de un canal simple glicosilado polipéptido. La folistatina se organiza en tres dominios homólogos cada uno de los cuales con >50% de homología <sup>12,13</sup> .

## **DISTRIBUCION TISULAR**

Activina, inhibina y folistatina fueron inicialmente aisladas del fluido folicular, donde se detectan en cantidades picomolares. Hasta hace poco tiempo la medida de estos péptidos en otros tejidos ha sido limitada por la falta de un ensayo sensible (como son reguladores locales, estos péptidos a menudo existen a muy bajas concentraciones). Mucha de la información sobre la distribución tisular de estos péptidos se ha basado en la detección de los correspondientes mRNAs, que aunque lo sugiere altamente, no garantiza la biosíntesis ó secreción de los péptidos. La distribución tisular se ha determinado en modelos animales, en numerosos tejidos reproductores y no reproductores que expresan la codificación de mRNAs de estos péptidos y el receptor de activina. Muchos tejidos contienen las 5 especies de mRNA, sugiriendo la presencia de un sistema regulatorio intrínseco <sup>3,14,15,16,17,18,19,20,21</sup> . **Tabla 1.**



**Figura 2. Tamaño de las isoformas posibles de inhibina A e inhibina B y subunidad  $\alpha$  en fluidos corporales. Mwt: peso molecular. kDa: kilodaltons**

**Tabla 1: Distribución tisular de mRNAs que codifica inhibina, activina, folistatina y receptor de activina.**

+ presente; - no presente;

+/- detectable a niveles muy bajos en algunos sistemas

? no analizado

## **DETERMINACION DE LA INHIBINA**

Aunque la localización de estos factores peptídicos en muchos tejidos sugiere efectos locales, la existencia de un sistema regulatorio local no niega un papel potencialmente importante para los factores circulantes en estos mismos tejidos. Así por ejemplo, en la pituitaria, las células gonadotropas contienen el mRNA necesario para producir inhibina y sin embargo se ha demostrado que

**Tabla I: DISTRIBUCIÓN TISULAR DE mRNAs QUE CODIFICAN INHIBINA, ACTIVINA, FOLISTATINA Y RECEPTOR DE ACTIVINA.**  
**+ presente; - no presente; +/- detectable a niveles muy bajos en algunos sistemas; ¿ no analizado**

	$\alpha$ -subunidad	$\beta A$ -subunidad	$\beta B$ -subunidad	Folistatina	Receptor de activina
<b>Tejido Reproductivo</b>					
<b>Pituitaria</b>	+	+/-	+	+	+
<b>Ovario</b>	+	+	+	+	+
<b>Testículos</b>	+	+	+	+	+
<b>Placenta</b>	+	+	+	+	+
<b>Tejido no reproductivo</b>					
<b>Cerebro</b>	+	+	+	+	+
<b>Hígado</b>	?	-	-	-	+
<b>Páncreas</b>	?	-	-	+	+
<b>Riñón</b>	+	-	-	+	+
<b>Suprarrenal</b>	+	+	+/-	+	+
<b>Médula ósea</b>	-	+	-	+	?

variaciones fisiológicas en los niveles de inhibina sérica contribuyen a la modulación de la secreción de FSH por las células gonadotrópicas de la pituitaria <sup>21,22</sup>.

De los tres péptidos, inhibina, activina y folistatina, inhibina parece ser el factor circulante más importante en el control de la función reproductiva. La activina y folistatina pueden ser detectadas en el suero pero sus niveles son relativamente bajos y permanecen estables a lo largo del ciclo reproductivo. En contraste, los niveles séricos de inhibina varían ampliamente a lo largo del ciclo menstrual y el estado reproductor a lo largo de la vida sugiriendo un papel en la modulación del eje pituitario–gonadal. La inhibina circulante se piensa que es de origen fundamentalmente gonadal pues sus niveles séricos caen rápidamente siguiendo la castración <sup>23,24</sup>.

La inhibina fue primeramente purificada de un origen ovárico, y la inhibina de un ovario bovino fue usada como el antígeno de uno de los primeros RIAs de inhibina que fue completamente caracterizado y aplicado para el estudio de la fisiología de la inhibina, siendo conocido ampliamente como “Monash ensayo” <sup>25,26</sup>.

La clonación de inhibina humana mostró que había dos especies mayores, inhibina A y B, dímeros que compartían una subunidad alfa común unida por puente disulfuro a una de las dos diferentes beta, betaA ó betaB. Ambas inhibinas eran detectables por la RIA por ser péptidos relacionados con la subunida alfa.

La aplicación del RIA para estudiar la fisiología de la inhibina en la mujer ha generado datos consistentes <sup>27</sup>. Sin embargo surgieron problemas con los

datos en el hombre pues fallaron en encontrar una correlación entre FSH e inhibina en desórdenes del epitelio seminífero que provocaban infertilidad <sup>28, 29</sup> . Esto se explicó posteriormente porque las células de Sertoli remanentes en el testículo de hombres severamente infértiles producirían especies de inhibina inmunorreactiva sin actividad biológica, conduciendo a elevados niveles de FSH. El ensayo heterólogo no distingue entre la forma dimérica (activa) y la alfa-subunidad libre (biológicamente inactiva).

Recientemente se han desarrollado ensayos específicos para las inhibinas diméricas A (29) y B <sup>30</sup>, dando luz a la situación, particularmente la reciente demostración que la inhibina B, inducible por FSH exógena <sup>31</sup>, es la única inhibina detectable en el hombre adulto, siendo sus niveles muy bajos en hombres con síndrome de Klinefelter y otras formas de severa infertilidad masculina. Recientes evidencias son consistentes con que la inhibina B es la forma relevante desde el punto de vista fisiológico en el feedback negativo de la FSH en el varón.

Existen además grandes cantidades de alfa subunidades inmunorreactivas presentes en el suero masculino y aparentemente sensibles a la estimulación de FSH en el hombre y en el mono Rhesus joven.

Otras complejidades se han identificado al reconocer que la inhibina en el suero y otros fluidos biológicos está presente en una variedad de formas de peso molecular, incluidos los precursores de la inhibina, debido en general a la ruptura en sitios específicos en ambas subunidades. La inhibina es encontrada en el suero humano como la madura 30K (alfa-beta), dímero con extensiones en cada una ó ambas subunidades, resultando en especies adicionales de peso 50-70 K y 9-110 K <sup>32</sup> . Parecería que la inhibina A y la B son procesadas diferencialmente en el



suero, con la alfa subunidad precursor de inhibina B más fácilmente seccionada que la de la inhibina A <sup>33</sup>. Estudios de Mason han expuesto que la actividad biológica in vitro de formas de alto peso molecular de inhibina no seccionadas, producidas por expresión recombinante, fue marcadamente reducida, sugiriendo que el procesamiento de inhibinas puede ser crítico para la actividad biológica. Se sugiere que la actividad biológica de la inhibina es dependiente en el grado de procesamiento de la subunidad, tanto en la circulación como en la pituitaria <sup>34</sup>.

Otro aspecto a destacar son las diferencias observadas en la determinación de la inhibina en el humano y en el mono. Las formas de alto peso molecular son fácilmente detectadas en el humano con inmunoensayos de la alfa-subunidad incluyendo el "Monash RIA" <sup>32,33</sup> no así en el mono, planteándose si es cuestión de especificidad del ensayo <sup>35</sup>.

Esfuerzos para desarrollar ensayos sensibles y específicos para medir los niveles de inhibina circulante han sido desarrollados en diversos laboratorios durante muchos años. Muchos ensayos iniciales para la medida de los niveles de inhibina circulante usaron anticuerpos que fueron generados frente a péptidos correspondientes a porciones N-terminal de la subunidad alfa de la inhibina ó a inhibina bovina purificada. El ensayo que se ha usado más ampliamente es un RIA heterólogo desarrollado por Robertson et al. <sup>36</sup> que usa un antisuero policlonal generado frente a inhibina bovina 31 kDa e inhibina radiomarcada 31 kDa como el trazador. Aunque reducidas y alquiladas, las alfa y beta A subunidades no presentaron reactividad cruzada, estudios subsecuentes usando subunidad alfa nativa reveló que en adición a la dimérica inhibina A y B, este ensayo detecta subunidad alfa libre <sup>36,37</sup>. La inmunorreactividad se ha incrementado después del tratamiento con FSH y LH en humanos y animales de

experimentación y ha cambiado durante las diferentes fases del ciclo menstrual. Sin embargo hubo una ausencia de la esperada relación inversa entre inhibina circulante y FSH en hombres con una variedad de desórdenes testiculares. Así, en algunos hombres con síndrome de Klinefelter los niveles de inhibina son bajos y en otros altos <sup>28</sup>. También se han informado cambios significativos en rangos biológicos e inmunológicos de inhibina circulante en diferentes situaciones fisiológicas y clínicas. Estos datos sugieren una considerable heterogenicidad molecular de las especies inmunorreactivas en el plasma <sup>38</sup>. Las dificultades para la medición de los niveles séricos de inhibina han sido diversas. Primero, el alto grado de homología estructural entre los diferentes miembros de la familia de la inhibina, conllevando una dificultad para desarrollar anticuerpos específicos con alta afinidad. Por lo tanto ha supuesto un reto desarrollar un ensayo que pueda discriminar entre proteínas que son estructuralmente relacionadas pero tienen diferente, ó no tienen, actividad biológica <sup>39</sup>. Reactividad cruzada con otros miembros diméricos de la familia, ó subunidades, puede confundir la interpretación de datos fisiológicos y pueden ser una explicación de la falta de relación esperada entre los niveles de inhibina sérica inmunorreactiva y FSH. Precursores de alfa subunidad están presentes en plasma y pueden tener reacción cruzada en ensayos que tienen epítipo especificidad en la alfa subunidad <sup>36,37</sup>. Debido a la falta de actividad biológica de las subunidades no combinadas, su reactividad cruzada distorsiona la correlación fisiológica entre FSH y la medida de la inmunorreactividad de la inhibina y razón biológicos/inmunológicos. Segundo, es aceptado en la actualidad que la inhibina existe en la circulación en muchas formas moleculares <sup>40</sup>. Diferentes especies moleculares reaccionan de forma cruzada con estos antisueros a una diferente extensión dependiendo de la

especificidad al epítipo. Por lo tanto no es del todo sorprendente que los valores obtenidos por diferentes ensayos en la misma muestra de suero difieran. También merece comentario el aspecto de las proteínas ligandos del plasma y su impacto potencial en la realización de los inmunoensayos.

Krummen et al. demostraron que la inhibina en el suero humano está unida a alfa 2 macroglobulina y folistatina <sup>41</sup>. La afinidad de la unión de la folistatina a la inhibina es mayor que la de la alfa 2 macroglobulina, pero esta última está presente en mucha mayor abundancia y en consecuencia mucha de la unión en plasma es a la alfa 2 macroglobulina. La afinidad de unión de estas proteínas ligandos por la inhibina es considerablemente inferior que la del antisuero. Consecuentemente la inhibina parece retener su actividad biológica FSH supresora y propiedades inmunológicas en muchos ensayos en la presencia de cantidades fisiológicas de alfa 2 macroglobulina.

Considerando estas dificultades se puede apreciar como un importante éxito la generación de una serie de "ensayos dirigidos a dos localizaciones", capaces de medir inhibina A, inhibina B ó pro-alfaC (precursor de la subunidad alfa) inmunorreactividad de forma fidedigna y específica <sup>29</sup>. Usando estos ensayos, Illingworth et al. <sup>42</sup> han publicado una correlación negativa entre las concentraciones séricas de inhibina B y FSH en donantes de semen, hombres infértiles, y hombres con elevadas concentraciones de FSH. Los niveles de inhibina A en hombres normales están por debajo del límite de detección de 2 pg/ml.. No se observó ninguna correlación entre inmunorreactividad pro-alfa C y FSH en estos desórdenes clínicos. Estos datos sugieren que la inhibina B puede ser la forma de inhibina fisiológicamente importante en el hombre desde la perspectiva de la regulación testicular de la producción de la pituitaria de FSH y

son consistentes con las observaciones de que la beta B es la subunidad beta predominante expresada en los testículos de los mamíferos<sup>43</sup>. También se han demostrado unos cambios periódicos en los niveles de inhibina A e inhibina B durante las diferentes fases del ciclo menstrual. Parece existir una relación recíproca entre concentraciones séricas de inhibina A y B; la inhibina B se eleva precozmente en la fase folicular mientras que la inhibina A es secretada predominantemente en la fase tardía folicular y en la fase lútea<sup>44</sup>.

Las células de Leydig parece que son también fuente de inhibina biológicamente activa y pueden generar unas significativas concentraciones de inhibina inmunorreactiva<sup>45</sup>. Es concebible que la inhibina inmunorreactiva medida en hombres con síndrome de Klinefelter se origina en las células de Leydig.

Por otro lado, aunque la subunidad alfa y sus formas precursoras y la inhibina A dimérica no tiene reacción cruzada de grado significativo en el ensayo inhibina B, no se ha clarificado que formas moleculares en adición a inhibina B son reconocidas por este ensayo. Esto es necesario ser determinado por el análisis “Western blot” del suero obtenido de hombres normales y aquellos con diferentes desórdenes reproductivos.

Continúa siendo un factor limitante la falta de disponibilidad de preparaciones de referencia de inhibina para uso como standard y la ionización de las preparaciones.

Debido a que los reactivos de la inhibina recombinante no han sido fácilmente disponibles para muchos investigadores, se han usado preparaciones biológicas parcialmente procesadas que han sido calibradas frente a preparaciones de referencia más purificadas. La limitada disponibilidad de reactivos ha

restringido la experiencia con estos ensayos a sólo unos pocos centros de investigación.

Con el ensayo descrito por Groome es de esperar que estos ensayos tengan un uso más amplio, permitiendo identificar situaciones en que la medida de inhibina A e inhibina B tenga valor clínico.

Con este ensayo se han detectado diferentes patrones de secreción de los distintos tipos de inhibina. La inhibina A es predominantemente secretada por el folículo dominante y cuerpo lúteo, mientras, en contraste, la inhibina B se eleva precozmente en la fase folicular y cae después.

El ensayo para la determinación de inhibina A, inhibina B y pro-alfaC-RI es un inmunoensayo tipo dos sitios enzima-conectados, basado en el uso de placas cubiertas con anticuerpos específicos para las beta A y beta B subunidades de la inhibina y la alfa subunidad pro secuencia, respectivamente. La fracción F(ab) de un anticuerpo R1 monoclonal de ratón para la porción terminal-N de la alfa subunidad de inhibina de 20Kda conjugado a fosfatasa alcalina fue usada para detectar en los ensayos de las tres sustancias.

El ensayo para la inhibina B usa un anticuerpo elevado frente a una secuencia cerca del C-terminal de la subunidad betaB humana <sup>44</sup>. El anticuerpo monoclonal fue inmovilizado en una placa hidracida. Antes del ensayo todas las muestras fueron tratadas 3 minutos a 100° para eliminar ligandos no específicos, y, entonces, pretratadas con peróxido de hidrógeno 1% durante 30 minutos.

## INTRODUCCIÓN.

---

La determinación de Inhibina B se realiza, pues, mediante técnica ELISA tipo Sandwich, su aplicación en la actualidad es experimental y sus valores se consideran provisionales.

En el estudio de Illingworth el nivel sérico de Inhibina B en **hombres normales** fue de 135,6 pg/ml., CI 108,4-169,4. La media de los valores fue geométrica con un intervalo de confianza +/- 95%. Todos los valores hormonales por inmunoensayo se asumió que tenían una distribución normal log... En este mismo estudio, un **grupo de donantes de semen** tuvo una media de concentración de inhibina B de 178,12 pg/ml. (CI 140,56-225,72). Nachtigall y Seminara encontraron en hombres normales unos valores de 239 +/- 14 pg./ml.(media +/- SEM). Estos mismos autores, en **hipogonadismos hipogonadotrópicos idiopáticos**, encontraron niveles medios entre 86 +/- 10 pg./ml. (media +/-SE) (rango 50-241, 13 de 31 hombres con niveles <= 50 pg./ml.) y 68 +/- 11 pg./ml. (media +/-SEM). Los niveles de inhibina B en pacientes con esta enfermedad, observados por Anawalt fueron de 45 +/- 11, siendo los datos expresados como valores medios y  $p < 0.05$  considerada significativa. Este mismo autor, y expresados los valores como se ha dicho previamente, encuentra niveles de inhibina B de 37 +/- 6 en **hombres infértiles con FSH elevada**, 11 +/- 3 en hombres con **síndrome Klinefelter no tratados**, y <10 en **hombres orquiectomizados**, frente a 187 +/- 28 en **hombres normales** ( $p < 0.05$ ). **Hombres con enfermedad primaria testicular** de causas y severidad variadas, como testes no descendidos, quimioterapia previa, oligo-azoospermia y trauma testicular, con FSH elevada, tuvieron concentración media de inhibina B de 21,08 pg./ml.(CI +/- 95%; 13,64-33,54), observado por Illingworth<sup>31,42,83,84</sup>.

### FISIOLOGIA DE LA INHIBINA

En 1923 Mottram y Cramer publicaron sus observaciones de que el tratamiento con radium de los testículos se asociaba con hipertrofia pituitaria y la aparición de células de castración. Esto condujo al concepto de la existencia de una relación recíproca entre la pituitaria y las gónadas<sup>46</sup>. Mc Cullagh en 1932 fue capaz de prevenir la hipertrofia y la aparición de células de castración en la pituitaria anterior inyectando extractos acuosos de los testículos dentro de las ratas machos castradas. Este extracto acuoso no tenía efecto en la atrofia de los órganos sexuales accesorios después de la castración. Mc Cullagh denominó al principio activo de este extracto acuoso “inhibina”<sup>47</sup>. La hipótesis de la inhibina concibió que este producto secretorio de los testículos serviría como un regulador selectivo de FSH<sup>1,39</sup>. Los cultivos de las células de Sertoli de las ratas eran capaces de secretar inhibina bioensayable y se postuló que las células de Sertoli eran la fuente testicular de la inhibina<sup>48</sup>.

Una larga serie de observaciones fisiológicas han proporcionado el apoyo al concepto de la inhibina como inhibidor selectivo de FSH, aunque algunos investigadores cuestionaron la existencia de esta proteína gonadal hasta que se aisló y caracterizó por diversos grupos a mediados de los años 80<sup>39</sup>.

Un obvio pronóstico de la hipótesis de la inhibina fue que existiría una recíproca relación entre los niveles séricos de inhibina y FSH. Si bien esta relación fue demostrada en ratas con formas varias de daño testicular<sup>49</sup>, muchos ensayos pioneros no consiguieron presentar la esperada relación inversa con los niveles de FSH séricos en hombres con desórdenes testiculares<sup>38</sup>, y esto originó

posteriores dudas acerca de la utilidad clínica de la inhibina como un marcador de la función testicular. En 1996 Illingworth et al. presentaron una convincente demostración de la relación inversa entre inhibina sérica y niveles de FSH en hombres, que fue pronosticada por la hipótesis de la inhibina <sup>42</sup>.

La elaboración de la hipótesis de la inhibina ha postulado que es un factor producido por el epitelio seminífero, específicamente por las células de Sertoli. El cultivo de células de Sertoli de la rata mostró que era capaz de secretar inhibina bioensayable, postulándose que la fuente de inhibina testicular eran las células de Sertoli <sup>48</sup>. Se aisló originariamente del fluido folicular del ovario. En un principio tanto la activina, inhibina y folistatina se pensó que actuaban únicamente como las clásicas hormonas endocrinas.

La inhibina derivada de los testículos es secretada en grandes cantidades dentro de los túbulos seminíferos, así como dentro de la circulación. Se desconoce si la inhibina B es producida exclusivamente por las células de Sertoli. Se ha comprobado que las células de Leydig han sido una fuente de inhibina biológicamente activa y generan una significativa concentración de inhibina inmunorreactiva <sup>45</sup>.

Los niveles de inhibina en la sangre de la vena espermática fueron cerca de 100 veces mayores que los niveles en sangre periférica en pacientes sometidos a castración por cáncer prostático. Después de la castración estos niveles cayeron rápidamente en 6 horas <sup>50</sup>. Los niveles circulantes de inhibina han seguido un ritmo circadiano, con niveles pico a las 9:00 AM horas y el nadir a las 10:00 PM horas, desconociéndose los factores responsables reguladores <sup>51</sup>.



Las subunidades alfa de inhibina y activina se han identificado en las células de Leydig y Sertoli por inmunohistoquímica<sup>52</sup>. Aunque estas subunidades peptídicas no se encontró que expresaran un estadio específico, los niveles de expresión de la beta subunidad de m RNAs se detectó que varió ampliamente entre los distintos estadios de la espermatogénesis<sup>52,53</sup>.

Como en el ovario, los niveles circulantes de inhibina generalmente reflejan la función testicular con niveles declinando en el hombre anciano<sup>51,54</sup>. La LH y la FSH estimulan la secreción de inhibina testicular, la cual circula a la glándula pituitaria para inhibir la secreción de FSH<sup>55</sup>.

Localmente el sistema inhibina-activina-folistatina se piensa que modula la esteroidogénesis y la gametogénesis. La activina derivada de las células de Sertoli se ha visto que incrementa la producción de andrógenos estimulada por LH en las células de Leydig, análogamente al efecto de la activina derivada de las células de la granulosa en la producción de esteroides por las células tecales. De forma inversa la inhibina descende la producción de andrógenos<sup>56</sup>.

Estos péptidos también pueden modular el proceso de espermatogénesis, como es sugerido por la expresión estadio-específica detectada en algunos estudios<sup>53,57</sup>.

La inhibina, activina y folistatina ejercen efectos en múltiples tejidos, incluyendo la suprarrenal, médula ósea y sistema nervioso central. El mRNAs de inhibina-activina están presentes en la glándula suprarrenal humana, así como la mRNA que codifica folistatina. No obstante no se ha determinado definitivamente para estos péptidos una función en la glándula suprarrenal del adulto, aunque la activina A se ha comunicado que incrementa la proliferación de células adrenales

en el feto humano y la producción de cortisol estimulada por ACTH <sup>58</sup>. Estos péptidos también pueden jugar un papel local en la eritropoyesis. Activina A producida por la médula ósea y células esplénicas, aumenta la proliferación de células progenitoras eritroides y acelera la diferenciación eritroide. Estos efectos son parcialmente bloqueados por inhibina y folistatina, factores que también pueden ser producidos en la médula ósea <sup>59,60</sup>.

También se ha investigado el papel de la inhibina-activina-folistatina en el desarrollo de los mamíferos. La amplia expresión de inhibina, activina y folistatina durante el desarrollo tardío sugiere funciones importantes durante la organogénesis normal. Estudios en gestación tardía en fetos humanos han demostrado inmunorreactividad para las tres subunidades de la inhibina y activina en los testes y ovarios <sup>61</sup>. En la mujer, la presencia de subunidad beta B durante el desarrollo parece ser crítica para la función reproductora normal en la vida posterior. Descendientes de ratones homocigotos para una mutación en el alelo (por ejemplo falta de activina B, activina AB e inhibina B) invariablemente mueren en el periodo perinatal <sup>62</sup>. El mRNA que codifica folistatina y las subunidades beta de inhibina y activina se ha identificado en el corazón, músculo esquelético, médula espinal, cerebro, riñón, suprarrenal, médula ósea e hígado en fetos humanos en la mitad de la gestación. En algunos de estos tejidos, tales como hígado y páncreas, la subunidad beta de inhibina y activina puede no ser expresada en el adulto, sugiriendo unas funciones restringidas al desarrollo. Es también de interés la presencia de subunidad alfa de la inhibina, que está limitada al tejido esteroideogénico (por ejemplo gónadas y adrenales). Esta observación es consistente con funciones del desarrollo específico de tejidos de la inhibina, en contraste a un probable papel más amplio para la activina <sup>63</sup>.

La activina estructuralmente se parece al factor de crecimiento TGF beta. La clase y función del receptor de la activina también mimetiza el sistema receptor del TGF beta<sup>64</sup>. Los receptores de la activina se pueden dividir en general en dos clases: Tipo I (Act R I) y tipo II (Act R II). Act R I liga activina con alta afinidad; sin embargo la unión sólo ocurre en presencia del péptido señalizador Act R II. A la inversa, la actividad del Act R II depende de la formación de un complejo con Act R I. Cuando la configuración es correcta, este complejo funciona como una quinasa-serina-treonina, transmitiendo información al interior de la célula por fosforilación de proteínas intracelulares a residuos aminoácidos de serina y/o treonina<sup>65,66</sup>. Los detalles de este patrón de señalización intracelular están actualmente poco comprendidos, pero puede incluir efectos en flujo del calcio y un patrón de activación de la proteína quinasa C<sup>67</sup>.

Se han detectado múltiples isoformas dentro de los receptores de la activina, clase I y clase II. Cada isoforma demuestra distinta afinidad y estructura del dominio citoplásmico (el sitio de la actividad quinasa). Esta observación plantea la posibilidad de que podrían ser alcanzadas respuestas dosis y célula específicas a través de la expresión de varias combinaciones de isoforma y número de receptor de activina<sup>65,66,68</sup>.

Sorprendentemente un receptor con afinidad específica por la inhibina no ha sido demostrado. Sin embargo la inhibina se ha presentado que se une a los receptores tipo II de la activina, aunque con afinidad inferior que la unión de la activina. Por lo tanto, más que actuar a través de un único receptor, la inhibina puede ejercer su efecto a través de la competición con la activina por los sitios del receptor de la activina.

Tampoco se ha encontrado un receptor específico para la folistatina. Como la folistatina tiene la habilidad de unirse a la subunidad beta común de la activina e inhibina, puede que interactúe indirectamente a través de uno ó de ambos factores <sup>69</sup>. La adición de folistatina bloquea la estimulación de la producción y secreción de FSH por la activina <sup>70</sup>. Por lo tanto la folistatina es considerada generalmente una proteína circulante cuyo papel es inhibir la función de la activina e inhibina, previniendo la interacción con sus receptores. Este concepto simple está recibiendo refinamiento al apreciar los investigadores que estos péptidos a menudo actúan próximo al sitio de secreción, comportándose más como factores de crecimiento que como hormonas clásicas.

Estudios de otras familias de factores de crecimiento, incluyendo la familia TGF beta de la cual la activina es miembro, sugieren un papel importante para los proteoglicanos sulfato-heparina de la superficie celular (proteínas asociadas a carbohidratos) en la regulación local de los factores de crecimiento <sup>65,71</sup>.

La folistatina se ha unido a los proteoglicanos heparin-sulfato de las células de la granulosa <sup>72</sup>. De esta manera se ha propuesto que la folistatina, cuando se une a los proteoglicanos ó a la activina ó inhibina, regularía la acción activina-inhibina al incrementar la concentración de la superficie mejorando la presentación del receptor ó descendiendo el aclaramiento de estos péptidos. El suero humano y el fluido folicular contienen una segunda proteína ligando, además de la folistatina, la alfa 2 macroglobulina <sup>73,74</sup>. La interacción de la activina ó inhibina con esta proteína de alta capacidad y baja afinidad, no altera su bioactividad, en contraste con el efecto de unión a la folistatina <sup>75</sup>. Parece ser que la relativa importancia de la alfa 2 macroglobulina y folistatina en la función de la activina-inhibina puede diferir entre distintos tejidos <sup>73,74</sup>.

La inhibina B se eleva precozmente en la fase folicular mientras la inhibina A es predominantemente secretada en la fase folicular tardía y fase luteal. Tanto la inhibina A como la B se piensa que son productos de las células de la granulosa, siendo la inhibina A secretada predominantemente en la fase luteal y la inhibina B en la fase folicular<sup>75</sup>. Particularmente la concentración de inhibina B circulante desciende con el incremento de la concentración de FSH sérica en la fase folicular precoz. Los niveles de inhibina B en la fase folicular y de inhibina A en la fase luteal se reducen en mujeres mayores en edad reproductiva respecto a los niveles en mujeres más jóvenes, contribuyendo a una elevación de los niveles de FSH en esta edad<sup>76</sup>. La inhibina dimérica A es secretada por el cuerpo lúteo<sup>77</sup>. La fuente de secreción de inhibina B se ha sugerido que es diferente de la fuente de inhibina A y estradiol<sup>77</sup>.

En el ovario humano las células de la granulosa de los folículos preantrales tardíos expresan folistatina y las subunidades beta A y beta B de la inhibina y activina. La subunidad alfa de la inhibina también es expresada por el estadio antral. Los niveles de folistatina y de las subunidades de inhibina y activina se incrementan en las células de la granulosa luteal a través de la fase luteal media y entonces descienden en la fase luteal tardía. La expresión de estos péptidos no se ve en las células intersticiales ni tecales, ni en los folículos atréticos<sup>78,79,80</sup>. La inhibina derivada del ovario es secretada en la circulación modulando la función pituitaria. Además estos péptidos también ejercen efectos localmente dentro del ovario. La inhibina no parece tener efecto en la secreción de sustancia P, sorprendentemente dado sus altos niveles durante la fase luteal<sup>81,82</sup>.

La producción de andrógenos estimulada por la LH es descendida por la activina e incrementada inhibina en cultivo de células tecales<sup>56</sup>.

En resumen, las gonadotropinas pituitarias estimulan la producción ovárica de activina, inhibina y folistatina, un efecto que es posteriormente modulado por factores de crecimiento y esteroides derivados del ovario. A través de un asa feedback, los péptidos gonadales regulan la producción de gonadotropina pituitaria y también actúan localmente para regular la producción de esteroides y la maduración folicular.

Mientras la aplicación del RIA para estudiar la fisiología de la inhibina en la mujer generó datos consistentes con un papel fisiológico de la inhibina en la mujer <sup>27</sup>, surgieron problemas con los datos obtenidos en el hombre. Estudios iniciales fueron prometedores como ya lo indicó Burger en 1992 <sup>78</sup>. Los niveles de inhibina inmunorreactiva estaban elevados en el momento de la activación del eje hipotálamo-hipofiso-testicular en los niños y ascendía durante la pubertad humana normal, correlacionándose con la elevación de los niveles de gonadotropinas y testosterona. Los niveles cayeron con el aumento de la edad en el hombre, fueron suprimidos por administración de testosterona exógena y respondieron a la administración de FSH y HCG sugiriendo la posibilidad de un control dual gonadotrópico, algo inesperado.

En contraste, en situaciones de desórdenes de la espermatogénesis con infertilidad masculina, no se encontraba correlación entre FSH e inhibina inmunorreactiva, con niveles en fallos severos de la espermatogénesis, por ejemplo en síndrome de Klinefelter, a veces normales e incluso elevados <sup>28</sup>.

La hipótesis de la inhibina postulaba que esta era un factor producido por el epitelio de los túbulos seminíferos específicamente las células de Sertoli, que estaba envuelta en la regulación de FSH, mientras la testosterona de las células de

Leydig era el factor primario de feedback para la LH. La testosterona se conocía que era capaz de suprimir la FSH. La falta de correlación entre inhibina y FSH en desórdenes del epitelio seminífero fue un misterio. Cuando se aclaró que péptidos relacionados con la alfa subunidad de la inhibina estaban presentes en la circulación <sup>79</sup> y que los cultivos de las células de Leydig testiculares de la rata podían secretar inhibina inmunorreactiva y podían ser estimuladas por LH <sup>80</sup> se encontró una posible explicación para los paradójicos hallazgos detectados en el síndrome de Klinefelter y otras formas de infertilidad masculina. Era posible que la inhibina bioactiva, normalmente secretada por las células de Sertoli, estaba ausente, pero que las células de Leydig, y, cuando eran evidentes, las células de Sertoli remanentes en el testículo de hombres severamente infértiles, fueran capaces de producir especies de inhibina inmunorreactiva sin actividad biológica y por lo tanto conduciendo a niveles elevados de FSH.

El reciente y muy importante desarrollo de ensayos específicos para inhibina dimérica A <sup>29</sup> y B <sup>30</sup> ha dado algo de luz a la situación, particularmente la demostración reciente que la inhibina B, que es inducible por FSH exógena <sup>31</sup> es la única inhibina detectable en el hombre adulto y sus niveles son muy bajos en hombres con síndrome de Klinefelter y otras formas de infertilidad masculina severa. Se han publicado numerosas evidencias consistentes con que la inhibina B es la inhibina fisiológicamente relevante envuelta en el feedback negativo en el hombre. La inhibina B está presente en la circulación del mono rhesus joven cuyo eje hipófiso-testicular ha sido estimulado por la infusión intravenosa intermitente de GnRH, aunque no está claro que la FSH específicamente estimulara los niveles de inhibina B en esta situación. No se ha encontrado una clara explicación para las mucho mayores cantidades, cuantitativamente, de

inmunorreactividad relacionada con la alfa subunidad presente en el suero masculino y aparentemente sensible a la estimulación de la FSH como se ha presentado en el hombre y en el mono rhesus <sup>35</sup>. ¿Cuál es la función de los péptidos relacionados con la alfa subunidad? ¿Surgen de los testículos? Algunas evidencias sugieren que puede que no <sup>81</sup>.

La inhibina derivada de los testículos es secretada en grandes cantidades en los túbulos seminíferos y en la circulación. Los niveles en la sangre de las venas espermáticas se ha encontrado que eran próximos a 100 veces superiores que los niveles sanguíneos periféricos, en pacientes sometidos a castración por cáncer prostático. Después de la castración estos niveles de inhibina circulante caen rápidamente en 6 horas <sup>50</sup>.

Las subunidades alfa y beta de la inhibina y activina se han identificado en las células de Leydig y de Sertoli por inmunohistoquímica <sup>52</sup>. Los niveles de expresión del mRNA de la beta subunidad se encontró que varió ampliamente entre distintos estadios de la espermatogénesis <sup>52,53</sup>.

Existen múltiples paralelismos entre la función y regulación de la inhibina en los hombres y las mujeres. Como en el ovario, los niveles de inhibina circulante generalmente reflejan la función testicular, declinando los niveles en el anciano <sup>51,54</sup>. La LH y FSH estimulan la secreción de inhibina testicular que circula a la pituitaria para inhibir la secreción de FSH <sup>55</sup>. Localmente, la inhibina, activina y folistatina se piensa que modulan la gametogénesis y la esteroidogénesis.

La inhibina desciende la producción de andrógenos <sup>56</sup>, al contrario que la activina derivada de las células de Sertoli que incrementa la producción de



andrógenos por las células de Leydig estimuladas por la LH, análogo al efecto de la activina derivada de las células de la granulosa en la producción de esteroides por las células tecaes.

La activina, inhibina y folistatina pueden modular el proceso de espermatogénesis como sugiere la expresión estadio-específico detectada en algunos estudios <sup>53,57</sup>. Por ejemplo, la activina estimula la producción de espermatogonias en cultivos de testículos de ratas <sup>82</sup>. La presencia de receptores de activina en la espermatogonia tardía y espermátide precoz sugiere que estos factores peptídicos son capaces de actuar directamente en las células espermáticas, antes que indirectamente vía la modulación de los niveles de andrógenos locales <sup>53</sup>. Cuando se ha determinado inhibina A, inhibina B e inmunorreactividad pro-alfa C relacionada, con ensayos específicos, "unión a enzimas por dos lados", en hombres sanos y en grupos de hombres que exhibían un amplio rango de concentraciones de FSH, que incluían donantes de semen, hombres infértiles y hombres con elevadas concentraciones de FSH, se ha encontrado que la inhibina A era indetectable (< 2 pg/ml), las concentraciones de inhibina B en hombres sanos fueron de 135,6 pg/ml, intervalo de confianza 108,4-169,4, y se apreció una estrecha correlación negativa entre las concentraciones séricas de inhibina B y FSH, de los donantes de semen, hombres infértiles y hombres con elevada concentración de FSH, aunque no en el grupo de voluntarios sanos <sup>44</sup>. Esto sugirió fuertemente que la forma fisiológicamente importante en el hombre es la inhibina B, la cual tiene un efecto crítico en la liberación de FSH, apuntando que la inhibina B puede ser un marcador sérico de la función testicular clínicamente útil. En otro estudio del mismo grupo se apreció que la inhibina B era un producto testicular único no detectable en el suero de hombres orquiectomizados, es

sensible a la estimulación de FSH, y tiene una relación recíproca con los niveles séricos de FSH en hombres con varias formas de enfermedad testicular <sup>83</sup>.

En pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático los niveles de inhibina B sérica basal fueron significativamente inferiores que los de los controles normales y correlacionados positivamente con el volumen testicular y una historia de pubertad espontánea sugiriendo influencias adicionales en la maduración en el volumen testicular y en la secreción de inhibina. Durante el remplazamiento a largo plazo con GnRH pulsátil estuvo asociado un significativo incremento de inhibina B durante el primer año y una negativa correlación de los niveles de FSH e inhibina B sérica. Esto demuestra la regulación gonadotropínica de la secreción gonadal de inhibina B y sugiere un papel putativo de la inhibina B en el feedback negativo de la regulación de FSH <sup>84</sup>.

Al estudiar la función de las células de Sertoli en el anciano, algunos autores han apreciado un progresivo aumento de la FSH con la edad y una fuerte correlación negativa entre la edad y el ratio inhibina B/FSH. Estas alteraciones han sugerido que con la edad se ve afectado el eje hipofisario-célula de Sertoli, aunque probablemente la función global de las células de Sertoli esté mantenida <sup>85</sup>.

## **POSIBLES APLICACIONES CLINICAS DE LA INHIBINA B EN EL HOMBRE**

- Se ha comunicado que es el mejor marcador disponible de la espermatogénesis en hombres subfértiles con una eficacia diagnóstica del 95% frente al 80% de la FSH en 218 hombres subfértiles <sup>86</sup>

- La inhibina B refleja la función de las células de Sertoli y su interacción con las espermatídes. La inhibina B y la FSH son una expresión del estado de la espermatogénesis de los túbulos seminíferos <sup>87</sup>, aunque la capacidad predictiva de la calidad de la espermatogénesis parece que no es superior a la determinación de los niveles séricos de FSH <sup>88</sup>.

-La inhibina B ha sido ligeramente más sensible que la FSH como índice del estado espermatogénico, aunque ninguna de las dos ha podido predecir el tipo de daño espermatogénico con exactitud como una biopsia testicular. La determinación combinada de ambas tuvo una alta especificidad y sensibilidad diagnóstica para la presencia de espermatídes elongadas en la biopsia testicular. La medida de inhibina B sérica mejora la sensibilidad de los tests predictivos de la presencia de esperma en la histología ó para la extracción de esperma testicular (TESE) pero no predice con eficacia el resultado de la TESE <sup>89</sup>.

- Con relación a la correlación con el recuento espermático se ha observado una correlación positiva de la inhibina B con éste <sup>86,88</sup>. Otros autores, sin embargo, no han encontrado correlación con la concentración espermática <sup>87</sup>.

- En relación con la histología, la inhibina B tuvo una correlación significativamente más fuerte que la FSH en el porcentaje de túbulos con síndrome de células de Sertoli sólo y con el porcentaje de túbulos con espermatídes elongadas <sup>89</sup>. Sin embargo otros autores han observado que aunque hombres con síndrome de células de Sertoli sólo tienen niveles inferiores que aquéllos con espermatogénesis normal, la distinción entre pacientes con hipoespermatogénesis de aquellos con normoespermatogénesis no es posible según los niveles de inhibina <sup>88</sup>.

- Los niveles de inhibina B se han correlacionado con la puntuación de la biopsia testicular<sup>86</sup>. Otros autores han presentado una significativa relación con el número de espermátides intratesticulares<sup>87</sup>.

- Los niveles basales de inhibina B en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático se han asociado positivamente con mayores rangos de fertilidad, sugiriendo que la secreción de inhibina B constitutiva (por ejemplo gonadotropin independiente) es un marcador de la madurez de los túbulos seminíferos de tal manera que la restauración de la estimulación por gonadotropinas resulta en una más rápida progresión a una espermatogénesis madura<sup>85</sup>.

- También se ha señalado que los niveles de inhibina B podría suponer un factor pronóstico de los resultados de la cirugía del varicocele respecto a la fertilidad.

## **SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO**

### HORMONAS DEL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO.-

#### **Gonadotropinas, esteroides y sus sitios de síntesis. Producción de gonadotropinas.-**

La regulación gonadal comienza en el hipotálamo, el cual sintetiza y libera, de forma pulsátil, el decapeptido hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La GnRH actúa directamente en las células gonadotropas las cuales son células específicas en la pituitaria anterior que sintetizan y segregan las gonadotropinas, hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH). FSH y LH son glicoproteínas las cuales presentan una similitud estructural con la hormona

estimulante del tiroides (TSH) y con la hormona gonadotropina coriónica y son los mediadores hormonales primarios de la función testicular. Estas glicoproteínas están constituidas de dos polipéptidos unidos de forma no covalente. Una proteína, la alfa-subunidad, es común a ambas hormonas, mientras que la beta-subunidad es única para cada una de ellas. La formación del heterodímero alfa-beta dentro del retículo endoplásmico de los gonadotropos es esencial para la actividad hormonal de las gonadotropinas. La síntesis y liberación de las gonadotropinas dentro de la pituitaria comprende un complejo proceso regulatorio. Los gonadotropos de forma individual son capaces de segregar FSH ó LH, ó FSH y LH. Se sabe que la LH es liberada de forma pulsátil, como resultado del estímulo pulsátil de GnRH que llega del hipotálamo. FSH es liberada con menos frecuencia y pulsos más irregulares que tienen menores amplitudes. En algunas especies, especialmente en aquellas que tienen variaciones estacionales en la espermatogénesis, existe otra hormona pituitaria, la prolactina, que tiene un papel en reiniciar la espermatogénesis.

### **Transformación de la señal FSH/LH.-**

Las hormonas glicoproteicas, tales como la FSH y LH desarrollan respuestas en células diana por interacción con receptores específicos proteicos en la membrana plasmática. La unión de la hormona a este receptor estimula una señal intracelular a un sistema de traducción y magnificación que resulta en un cambio bioquímico dentro de la célula diana. Los receptores para la FSH, LH y hormona estimulante del tiroides constituyen una subfamilia estrechamente relacionada de receptores de proteínas G unidas que se distinguen por un relativamente importante dominio externo. Estructuralmente, los receptores de uniones de

proteínas G se caracterizan por una región de hélices hidrófobas las cuales sobrepasan la membrana siete veces y sujetan la porción externa de la proteína a la membrana plasmática donde ella puede actuar con su ligando. En el testículo, las células de Sertoli tienen los receptores de membrana que las convierten a ellas en células diana para la acción de FSH. La LH se une a receptores de membrana en las células de Leydig y estimulan la producción de testosterona. Las proteínas G son una gran familia de proteínas intracelulares unidas a la membrana que traducen señales que producen reacciones tales como la producción de cAMP y la estimulación subsiguiente de la fosforilación de proteínas a través de kinasas. Muchos de los cambios en la actividad celular que ocurren debido a la acción de las gonadotropinas son el resultado de la fosforilación de proteínas específicas.

### **Sitios de acción de las gonadotropinas.-**

Las células de Leydig estimuladas por la LH convierten el colesterol en testosterona la cual posteriormente se acumula en el intersticio y en los túbulos seminíferos a unas concentraciones relativamente altas. Los andrógenos extracelulares son orientados para relacionarse con proteínas transportadoras tales como la proteína de unión a los andrógenos (ABP) producida por las células de Sertoli ó la globulina de unión a la testosterona (TeBG) producida por el hígado. La suprarrenal también produce andrógenos; sin embargo, la contribución de esteroides adrenales a la función testicular en hombres normales es insignificante. Las células diana para la testosterona dentro del testículo son las células mioideas peritubulares y las células de Sertoli. Existe evidencia de que las células germinales no responden directamente a los andrógenos. En algunas especies, una parte de la testosterona puede ser convertida en estrógenos por las células de

Sertoli ó las germinales. Los estrógenos entonces retroinforman para reducir la estimulación de LH de la biosíntesis de testosterona en las células de Leydig.

La FSH estimula una variedad de funciones en las células de Sertoli que incluyen la síntesis de proteínas segregadas, como la transferrina, que están envueltas en la transferencia de nutrientes a las células germinales. En respuesta a la acción de la FSH las células de Sertoli también producen inhibina la cual, junto con la testosterona, está envuelta en la regulación por retroinformación de la función pituitaria. La inhibina reduce de forma importante la liberación de FSH mientras que la testosterona inhibe la secreción de LH.

### RELACION ENTRE LAS HORMONAS DEL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO.-

La integración del hipotálamo, hipófisis y testículos es de gran importancia para al función reproductiva. El hipotálamo comprende la pared lateral de la parte inferior del tercer ventrículo del cerebro. La pituitaria, una glándula endocrina conectada con el hipotálamo en la base del cerebro está dividida en dos partes: la neurohipófisis ó lóbulo posterior , y la adenohipófisis ó lóbulo anterior. La neurohipófisis, la cual está compuesta de la eminencia media, tallo infundibular y proceso infundibular recibe la entrada de nervios desde el cerebro. En contraste, la adenohipófisis, compuesta de la *pars tuberalis*, *pars intermedia* y *pars distalis*, es tejido glandular y de este modo es regulado por factores liberados en la circulación sanguínea.

Algunas de las neuronas neurosecretoras del hipotálamo envían sus axones descendentes hasta la neurohipófisis. Cuando son estimuladas por la despolarización estas neuronas liberan la hormona vasopresina (también llamada

hormona antidiurética) y oxitocina de los gránulos secretorios dentro del torrente sanguíneo. La oxitocina causa contracción del músculo liso, incluyendo aquél del tracto reproductor masculino, y la vasopresina actúa en el riñón para producir retención de agua. A diferencia de la neurohipófisis, la adenohipófisis está regulada por péptidos y monoaminas que son sintetizadas y secretadas por neuronas específicas hipotalámicas cuyos axones terminan, no en la adenohipófisis, sino en la eminencia media cerca del tallo infundibular. Estas hormonas, hormonas hipofisotrópicas son transportadas por el sistema portal sanguíneo de la pituitaria desde la eminencia media hasta la adenohipófisis donde estimulan la síntesis y secreción de las hormonas adenohipofisarias.

Hay tres clases generales de hormonas adenohipofisarias sintetizadas y secretadas por la *pars distalis* de la adenohipófisis: hormonas glicoproteicas, péptidos corticotropin-relacionados y hormonas somatomamotrópicas. Las hormonas glicoproteicas, hormona luteinizante (LH), y hormona estimulante de los folículos (FSH) tienen unos efectos ya bien establecidos en los testículos; LH estimula la secreción de testosterona por las células de Leydig, y FSH actúa en los túbulos seminíferos para promover la espermatogénesis. La síntesis y secreción de LH y FSH están reguladas, en parte, por un decapeptido desde el hipotálamo, hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Cuando se administra a humanos ó a mamíferos del laboratorio, GnRH causa secreción al torrente sanguíneo de LH, y en menor medida FSH. Basándose en la estructura conocida de GnRH, se han sintetizado un número de análogos, algunos de los cuales son más potentes que la GnRH natural y son capaces de incrementar la secreción de LH y FSH cuando son administrados. Los antagonistas de GnRH ó antiseros bloquean los efectos de la GnRH endógena y por lo tanto reducen los niveles de



gonadotropinas. La LH es secretada de forma distinta, como pulsos cortos en respuesta a la liberación pulsátil de GnRH. La importancia de la secreción pulsátil de GnRH está claramente ilustrada por el efecto de la administración intermitente vs continua de GnRH en la secreción de LH y FSH en hombres con hipogonadismo por deficiencia de GnRH; LH y FSH pueden ser restauradas a sus niveles normales en suero cuando la GnRH es administrada intermitentemente, pero no cuando es administrada continuamente. Además, la señal hormonal sostenida puede inhibir en vez de estimular las células diana.

Las señales episódicas de LH que son liberadas a los testículos por el sistema vascular testicular estimulan la síntesis y secreción de testosterona por las células de Leydig. Igual que la LH la testosterona es secretada en pulsos. Con frecuencia son vistos pulsos de testosterona desde las células de Leydig en relación a pulsos de LH desde la adenohipófisis, aunque los pulsos de LH no necesariamente son seguidos ó precedidos de un pulso de testosterona. Es destacable que la máxima esteroidogénesis ocurre a concentraciones de LH que son suficientes para ocupar sólo una pequeña fracción del número total de receptores de LH disponibles en la superficie de las células de Leydig. La importancia de esta sobreabundancia de receptores es desconocida. Los picos de testosterona ocurren en la sangre periférica del feto de 12-18 semanas, y del neonato de 2 meses. En el periodo prepuberal la testosterona desciende a niveles inferiores. Durante la pubertad se incrementan marcadamente (12-17 años) y consigue su nivel máximo durante la segunda y tercera décadas de la vida adulta. Entonces ocurre un lento descenso a lo largo de la quinta década, con un descenso más dramático a partir de entonces. Sobrepuestas a estas fluctuaciones están otras anuales, diarias y horarias.

Además de la regulación por los pulsos hipotalámicos de GnRH, la LH y en menor medida la FSH están reguladas por la retroalimentación negativa de las hormonas esteroideas producidas por los testículos. La testosterona, por ejemplo, informa negativamente a nivel del hipotálamo, enlenteciendo la generación de pulsos de GnRH y, por lo tanto, inhibiendo los pulsos pituitarios de LH. Adicionalmente, el testículo es capaz de metabolizar la testosterona a estradiol vía la actividad de la aromatasa en los túbulos seminíferos e intersticio. El estradiol, cuando está presente en concentraciones fisiológicas, es también capaz de inhibir la frecuencia y amplitud de la liberación episódica de LH. El efecto de esta información negativa es aparente en hombres después de la castración; la pérdida de esteroides testiculares resulta en una secreción marcadamente incrementada de LH y FSH. Cuando a estos hombres se les da testosterona exógena, los niveles de LH en sangre disminuyen y la pulsatilidad de LH retorna a la normalidad.

La importancia de la integración del eje hipotálamo-hipófiso-testicular es obvia a la vista del papel crítico de LH, FSH y testosterona en la espermatogénesis. La testosterona, regulada por LH, es un requerimiento absoluto para la espermatogénesis normal. FSH juega un papel significativo en la iniciación de la espermatogénesis en la pubertad, pero su papel en el adulto es menos cierto.

## **HIPOGONADISMOS EN EL VARON**

### **Definición y Clasificación.-**

Es la disminución de la secreción hormonal androgénica (testosterona) y espermossecretora ó seminífera. Pueden ser:

- 1) Hipogonadismos primitivos: por la aplasia ó destrucción total de los testículos por castración ó eunuquismo.
  
- 2) Hipogonadismos hipofisarios ó secundarios: por la falta de desarrollo con atrofia testicular secundaria a la ausencia de estímulos hipofisarios gonadotrópicos por un trastorno hipotálamo-hipofisario.

Los pacientes con subandrogenización y niveles séricos reducidos de testosterona suelen caer en una de estas dos clases fisiopatológicas. Estas dos categorías generales se pueden diferenciar por la medición de los niveles séricos de LH y FSH.

Los pacientes con daño primario de las células de Leydig muestran inhibición reducida por retroalimentación de la secreción de gonadotropinas, lo que resulta en concentraciones séricas elevadas de LH y FSH: Por lo tanto este trastorno se clasifica como hipogonadismo hipergonadotrófico. Los pacientes con niveles séricos bajos de testosterona y niveles séricos bajos ó normales bajos inapropiados de LH se clasifican como pacientes con hipogonadismo hipogonadotrófico. Estos pacientes presentan un alteración que afecta al hipotálamo ó a la hipófisis. Este defecto puede ser estructural, como un tumor hipotalámico ó hipofisario. Con mayor frecuencia se debe a una de las siguientes causas: 1) administración de fármacos que inhiben el eje hipotalámico, como tranquilizantes ó estrógenos, agonistas de la LH-RH, 2) incapacidad congénita de sintetizar GnRH ó LH y FSH, como en el hipogonadismo hipogonadotrófico congénito ó 3) mecanismos de control hipotalámico alterado, como en la caquexia ó en la anorexia nervosa.

## HIPOGONADISMOS HIPOGONADOTROPICOS

Es el fallo de la secreción episódica de GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) desde el hipotálamo, resultando el síndrome de hipogonadismo hipogonadotrópico. La secreción deficiente de GnRH puede ocurrir de forma aislada (Hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático), en asociación con anosmia (Síndrome de Kallmann) ó como resultado de una variedad de lesiones estructurales y funcionales del eje hipotálamo-pituitario.

En la vida adulta hay divergencia en el patrón de secreción de gonadotropinas entre los distintos sexos. En la evaluación de 30 hombres sanos a los que se extrajo una muestra sanguínea a intervalos de 10 minutos durante 24 horas, se detectaron pulsos de LH aproximadamente cada 2 horas. Sin embargo una llamativa variabilidad fue observada en los patrones de pulsos de LH, que se acompañó de un amplio rango en el patrón secretor de testosterona. De esta manera, en el 15% de hombres normales se documentaron niveles séricos de testosterona tan bajos como 100 ng/ml (para convertir en unidades del sistema internacional multiplicar por 0,0347) a lo largo de intervalos entre los pulsos de LH<sup>90</sup>. Se debe tener conciencia de esta potencial variación intrapaciente que es de crítica importancia al interpretar un único nivel sérico de testosterona y LH obtenido durante la evaluación de un hombre con sospecha de hipogonadismo hipogonadotrópico.

En caso de hipogonadismo hipogonadotrópico se deben diferenciar:

a) Causas estructurales como tumores (craneofaringiomas, germinomas, gliomas, meningiomas), alteraciones infiltrativas (sarcoidosis, hemocromatosis, histiocitosis X), traumas craneales, radioterapia

b) Causas funcionales como el ejercicio, alteraciones dietéticas e ingesta de esteroides anabólicos.

c) Causas idiopáticas: Hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (IHH), síndrome de Kallmann, IHH brusco del adulto, síndrome del eunuco fértil, pubertad retardada y hipoplasia adrenal congénita.

d) Miscelánea: Síndrome de Prader-Willi, síndrome de Laurence-Moon-Biedl, y síndrome de Möebius.

Se han observado una amplia gama de patrones aberrantes de secreción de gonadotropinas en sujetos varones con deficiencia aislada de GnRH<sup>91</sup>. En la mayoría de los pacientes no se han detectado pulsos de LH (Patrón apulsátil), reflejando la forma más severa de la deficiencia de GnRH. En un segundo grupo se detectaron pulsaciones de LH fundamentalmente nocturnas (Patrón de detención). En otro grupo de pacientes se ha detectado un patrón de pulsos de igual frecuencia que el normal pero de amplitud disminuida respecto al normal (Patrón de amplitud disminuida).

La deficiencia aislada de GnRH se destaca por su heterogenicidad genética que puede ser heredada como un trastorno autosómico dominante, autosómico recesivo ó ligado al sexo. Esta variabilidad en su expresión sugiere que algunos individuos con deficiencia aislada de GnRH pueden formar parte de un único espectro diagnóstico de hipogonadismo.

## **AGONISTAS LHRH y ANTIANDRÓGENOS EN CANCER DE PROSTATA: CONSIDERACIONES BASICAS**

El cáncer de próstata es el cáncer más común en hombres americanos y la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres, superado sólo por el cáncer pulmonar. La incidencia de cáncer de próstata se ha incrementado de forma pronunciada en los últimos años debido al aumento de la concienciación pública, programas de examen masivo poblacional, amplio uso del antígeno específico de próstata (PSA), y avances en las técnicas de imagen. El cáncer de próstata supone alrededor del 13% de las muertes relacionadas con el cáncer. Este tumor afecta en primer lugar a hombres de edad superior a 70 años.

Aproximadamente el 30-35% de los pacientes con cáncer de próstata se presentan con afectación regional ó metástasis a distancia, mientras que un 25% adicional desarrollaran metástasis en el curso de la enfermedad. Las metástasis son comunmente al hueso y las lesiones pueden ser vistas en RX como lesiones osteoescleróticas ó en gammagrafía ósea como áreas de incremento de actividad. Los pacientes que se presentan con enfermedad metastásica y que son tratados con deprivación de andrógenos tienen una supervivencia media de 2,5 años.

La terapia hormonal del cáncer de próstata está basado en el hecho de que muchos cánceres de próstata sólo crecerán en la presencia de la hormona masculina testosterona. En tales casos, el cáncer podrá ser reducido por largos periodos de tiempo y se podrá detener su crecimiento, si la hormona testosterona es suprimida. Se pueden utilizar dos métodos para este objetivo, medicamentoso y orquiectomía .

Hace muchos años se descubrió que en pacientes que tenían cáncer de próstata metastático en los testículos se podía conseguir la remisión si sus testículos eran extirpados. Dado que los testículos son la principal fuente de hormona masculina en el cuerpo, aquel es un efectivo método de disminuir el nivel de testosterona. Esta actuación tiene escasos efectos secundarios excepto una molestia leve durante unos pocos días del postoperatorio. Huelga decir, sin embargo, que hay razones psicológicas para disuadir al varón de este método.

Por este motivo se han desarrollado varias aproximaciones médicas para descender la producción de testosterona en el cuerpo. El método pionero fue aportar hormonas femeninas (estrógenos) las cuales suprimirían la producción de hormonas masculinas por un mecanismo de retroinformación a la glándula pituitaria en el cerebro, la cual controla la producción testicular de testosterona. El método es simple y barato, pero se han comunicado efectos secundarios que incluyen sofocos y, más importante, un incremento de la incidencia de ataques cardíacos en pacientes sometidos a este tratamiento durante largos periodos de tiempo.

Más recientemente se han presentado medicaciones inyectables tan efectivas como la orquiectomía para descender los niveles hormonales y controlar el cáncer. Otras medicaciones como los antiandrógenos se añaden en ocasiones para un control hormonal adicional.

Las terapias hormonales son generalmente reservadas para los pacientes con evidencia de diseminación del cáncer a otras partes del cuerpo ó cuando ha fallado otro tipo de tratamiento del cáncer. Algunas ocasiones se utiliza de forma

temporal para reducir el cáncer y facilitar otro tratamiento como por ejemplo la radioterapia.

Estos tratamientos hormonales suelen ser bien tolerados por el paciente y son frecuentemente efectivos durante largos periodos de tiempo. La terapia de deprivación hormonal es una alternativa razonable para el paciente que tiene un cáncer de próstata de grado bajo-moderado y un limitado tiempo de supervivencia, una enfermedad de Alzheimer precoz, ú otras limitaciones de su vida que sugieran que es improbable que su cáncer de próstata se convierta en evidente durante el resto de su vida.

Algunos análogos LH-RH a los que se ha sustituido la posición 6,10 ó ambas, son mucho más activos que la LH-RH y también poseen una actividad más prolongada <sup>92,93,94,95 96,97,98,99</sup>. Los agonistas LH-RH más importantes y sus potencias están recogidos en la **Tabla III**. Aunque una única inyección de un superactivo agonista de la LH-RH induce una marcada y prolongada liberación de LH y FSH, paradójicamente, la administración crónica produce un efecto inhibitorio dramático a través de un proceso de "caída de la regulación" de receptores de membrana de la pituitaria para la LH- RH, desensibilización de los gonadotropos pituitarios y reducción en los receptores gonadales para la LH y FSH <sup>98, 100</sup>

En animales del sexo masculino esta inhibición del eje pituitario gonadal se manifiesta por un marcado descenso en la secreción de LH y FSH, supresión de la esteroidogénesis testicular, una reducción en los niveles plasmáticos de testosterona y una caída en el peso de los testículos, vesículas seminales y próstata <sup>93,94, 101,102,103</sup>. En el hombre una supresión persistente de la función de las células



de Leydig, manifestada por una caída en la testosterona sérica y 5 alfa dehidrotestosterona (DHT), ha sido observado después de la administración crónica de Triptorelina y otros agonistas LH.-RH <sup>104</sup>. Todos estos fenómenos descritos forman la base para las aplicaciones oncológicas de los agonistas LH-RH.

**TABLA III. Principales agonistas LHRH y su potencia relativa.**

**TABLA II. Agonistas LHRH utilizados más frecuentemente en la clínica y su potencia relativa.**

ESTRUCTURA											Potencia relativa
LHRH natural	P-GLU 1	HIS 2	TRP 3	SER 4	TYR 5	GLY 6	LEU 7	ARG 8	PRO 9	GLY-NH2 10	1
Buserelina						D-SER				Etilamida	140
Leuprorelina						D-LEU				Etilamida	50
Triptorelina						D-TRP					144
Goserelina						D-SER				Az-GLY-NH2	50

Está bien establecido que alrededor del 70% de los cánceres de próstata humanos son testosterona-dependientes <sup>104,105,106</sup>. El tratamiento del cáncer de próstata avanzado (estadío C ó D) está usualmente basado en la dependencia androgénica del tumor <sup>104,105,106</sup>. La terapia endocrina para el cáncer de próstata incluye orquiectomía, hipofisectomía, y administración de estrógenos ó antiandrógenos. Sin embargo, la castración quirúrgica está asociada a un impacto psicológico y los estrógenos tienen unos efectos secundarios cardiovasculares, hepáticos, y mamotróficos. Una radicalmente diferente terapia endocrina y sin toxicidad aparente se basa en el uso de agonistas de la LH-RH <sup>92,107,108</sup>.

La observación de que el tratamiento prolongado con agonistas de la LH-RH puede resultar en inhibición testicular y castración química provocó el usar este método en un intento de inducir la regresión de los tumores de próstata en modelos de rata <sup>109</sup>. El tratamiento de ratas macho portando el adenocarcinoma de próstata Dunning R3327 H con Triptorelina, redujo el porcentaje del incremento del volumen tumoral a un tercio y descendió el peso del tumor un 58% comparado con controles no tratados. Los niveles séricos de LH, FSH, Prolactina y testosterona fueron significativamente reducidos después del tratamiento con triptorelina.

La disminución de la LH debido al tratamiento con agonistas LHRH disminuye la secreción y síntesis de testosterona y, por consiguiente, la aromatización periférica de ésta, con reducción consiguiente del nivel plasmático de estradiol.

Los andrógenos son imprescindibles para el mantenimiento de la homeostasis prostática y para el desarrollo del cáncer de próstata. El 95% de la testosterona

circulante es producida por los testículos. Aunque los andrógenos suprarrenales representan una mínima parte de los andrógenos circulantes en el varón sano, en los pacientes que han sido sometidos a orquiectomía se considera que pueden llegar a representar el 40% de los andrógenos intraprostáticos. Esto justificaría la realización de un bloqueo androgénico máximo combinando orquiectomía ó análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante con antiandrógenos, aunque el beneficio de esta asociación con respecto al tratamiento con agonista sólo en la supervivencia, en pacientes con cáncer de próstata metastásico ó avanzado, ha sido pequeño y no significativo. Los antiandrógenos son sustancias que bloquean competitivamente el receptor de andrógenos localizado en el núcleo de las células de la próstata normal ó maligna. Existen dos tipos de antiandrógenos: los esteroideos como el acetato de ciproterona y los puros, o no esteroideos, como la flutamida, nilutamida y bicalutamida.

El acetato de ciproterona es un derivado de la hidroxiprogesterona. Inhibe el desarrollo de todos los órganos y funciones desarrolladas por los andrógenos. Además, al ser un potente progestágeno, inhibe la secreción de gonadotropinas. En la fase inicial del tratamiento con análogos LHRH inhibe, al menos en parte, el aumento de la testosterona que se produce durante la primera semana de dicho tratamiento que es el causante del potencial agravamiento de síntomas del cáncer de próstata en esa fase. También por su acción progestágena disminuye la actividad adrenérgica hipotalámica y puede evitar ó reducir la severidad de los sofocos asociados con la orquiectomía ó el tratamiento con agonistas LHRH. Entre sus efectos adversos más frecuentes se encuentran la pérdida de libido y la potencia sexual. La ginecomastia y dolor mamario aparecen en el 13% de los

casos y la miocardiopatía isquémica y enfermedad tromboembólica en el 5% de los pacientes.

La flutamida es un derivado anilínico que se absorbe rápidamente en el tubo digestivo y es metabolizada en su sustancia activa, la 2-hidroxi flutamida. Por su vida media de 5-6 horas se debe administrar 3 veces al día. No produce ningún efecto progestacional ya que su efecto es solamente el bloqueo de la unión entre la dihidrotestosterona y su receptor. Su utilización más frecuente es en asociación con orquiectomía ó con análogos LHRH para obtener un bloqueo androgénico máximo. Sus efectos adversos más frecuentes son ginecomastia (40-45%), alteraciones hepáticas (2-5%) y gastrointestinales, con diarrea en el 20% de los casos. Sin embargo, por las características de su efecto antiandrogénico la flutamida mantiene la potencia sexual y la libido en el 50-90% de los pacientes en monoterapia.

La bicalutamida es el último de los antiandrógenos puros desarrollados. Su vida media de eliminación plasmática es de una semana por lo que se administra en una sola toma diaria. En pacientes que reciben monoterapia con bicalutamida se observa elevación de niveles séricos de LH, FSH, Testosterona y estradiol, pero en la mayoría de los casos los niveles hormonales han permanecido dentro del rango normal. Entre sus efectos adversos más frecuentes son mastodinia y ginecomastia en el 36% y 25% de los casos respectivamente a dosis de 50 mg al día y más frecuente a más dosis. La diarrea aparece en el 10% y alteraciones de las pruebas hepáticas en el 1,7% que se han corregido al suspender el tratamiento.

## TRATAMIENTO CON AGONISTAS LHRH

El término hormona liberadora de gonadotropinas (Gn-RH) fue dado al decapeptido hipotalámico aislado que mediaba la síntesis y liberación de hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo (FSH) desde la pituitaria <sup>92</sup>.

El aislamiento y síntesis del decapeptido natural fue rápidamente seguido de la síntesis de una serie de análogos denominados agonistas ó superagonistas dado que ellos son capaces de liberar más gonadotropinas durante periodos más largos de tiempo debido a una incrementada capacidad de unión a los receptores gonadotropínicos en la pituitaria <sup>93</sup>.

Con la administración crónica, esta sobreestimulación conduce a una desensibilización , ó sub-regulación del receptor resultando en supresión de la secreción de gonadotropinas y conduciendo a la inhibición de las secreciones gonadales. Estos efectos estimulatorios e inhibitorios tienen un amplio potencial terapéutico especialmente en enfermedades relacionadas con la LH <sup>94</sup>.

La secreción de gonadotropinas es regulada normalmente por ráfagas episódicas de secreción de LH-RH desde el hipotálamo <sup>95</sup>. En el sistema normal es indispensable una interacción muy corta de LHRH con los receptores de la pituitaria para una consistente activación de la secreción de gonadotropinas seguida de un tiempo de recuperación para establecer la sensibilidad para la siguiente ráfaga <sup>96</sup>. Subsecuentemente una prolongada ocupación del receptor por LHRH causa una desensibilización y una pérdida del receptor por internalización, degradación de los complejos de receptores hormonales y depleción del almacén de LH.

Pulsos a intervalos cortos, mayores que las dosis fisiológicas (1-2 microgramos LHRH) ó constante liberación, estimulan la liberación de LH a un pico seguido de un descenso a los niveles basales de LH en el suero. FSH sigue un patrón esencialmente similar.

El marcado descenso en la LH y FSH séricas durante un periodo mayor de 6 meses no suprime los receptores a la LH ó la respuesta a la estimulación de la LH. El efecto de las gonadotropinas en la esteroidogénesis testicular durante el tratamiento con LHRH persiste, lo cual descarta un efecto testicular directo del tratamiento con LHRH<sup>97</sup>.

De significado practico es la observación que los mecanismos del receptor rápidamente se adaptan a los cambios en dosis y modo de administración, lo cual hace que la inhibición de las gonadotropinas sea fácilmente reversible dado que la síntesis de nuevos receptores requiere sólo 2 a 7 días<sup>98</sup>. Estudios morfológicos en las células LH de la pituitaria en el perro después de tratamiento a largo plazo con LH confirma esta posibilidad de completa reversibilidad<sup>98</sup>.

La estructura de los agonistas LHRH usados en la clínica se asemeja a la del decapeptido natural. Todos tienen el mismo terminal -N (Tyr) donde la secuencia C ha sido cambiada a análogos nonapeptido etilamida ó al análogo decapeptido Aza gly. Ambos grupos de agonistas son sustituidos en posición 6 (glicina) por un natural ó no natural aminoácido D y conduce a su alta potencia biológica, aumentando la afinidad al receptor e incrementando la resistencia a la degradación enzimática<sup>100</sup>.

Los efectos biológicos son proporcionales a la capacidad de unión a los receptores LHRH de la pituitaria. Todos los agonistas usados en la clínica comparten la

estimulación transitoria de la liberación de LH lo cual resulta en un incremento de los niveles séricos de testosterona en pacientes con testículos normales. Esta fase estimuladora es seguida de un descenso en la liberación de LH lo cual resulta en niveles de castración de testosterona sérica en pacientes varones. Este efecto de castración médica es el efecto deseado del tratamiento con agonistas LHRH en pacientes con cáncer de próstata avanzado.

En general existe un retraso de 14-28 días desde la administración para observar una completa inhibición de la liberación de LH durante la estimulación suprafisiológica.

Una liberación de la droga ininterrumpida a largo plazo a una dosis adecuada es vital en el tratamiento del cáncer prostático. El tratamiento oral es excluido debido a la naturaleza peptídica de las drogas. Los principales sistemas de liberación de la droga disponibles en la actualidad son inyecciones subcutáneas e intramusculares de preparaciones biodegradables depot. Cada uno de estos sistemas de liberación de la droga ha sido evaluado en pacientes en ensayos clínicos. El Leuprolide y la Triptorelina se administran vía intramuscular. Buserelin y Goserelina se administran vía subcutánea.

Los vehículos más usados son el copolímero de ácido láctico/ácido glicólico ó formulaciones microcapsulares.

La típica fluctuación sérica de LH después del tratamiento con agonistas LHRH consiste en una excesiva elevación de LH sérica seguido de un constante descenso a niveles basales de 2-5 mIU/ml<sup>101</sup>. La FSH también desciende pero en un grado menor que la LH y presenta un pequeño escape después de con seguir un valor mínimo al mes de la terapia.



De mayor importancia es el incremento subsiguiente de la testosterona sérica desde  $4,8 \pm 2,2$  ng/ml a  $5,6 \pm 2,4$  ng/ml seguido de una caída a rango de castración después de 4 semanas de tratamiento. Esta caída de la testosterona sérica se correlaciona con un descenso en la dehidrotestosterona (DHT) sérica al 18% de sus niveles normales (100,101). Los valores pre-tratamiento de andrógenos adrenales, tiroxina, cortisol y prolactina permanecen invariables por periodos superiores a 36 meses en el seguimiento de algunos pacientes <sup>102</sup>.

Resultados similares en la supresión de testosterona a niveles de castración fueron obtenidos con buserelin <sup>101,102</sup>, leuprolide <sup>103</sup>, triptorelina <sup>104</sup>, goserelina <sup>105</sup>.

El tratamiento con LHRH estimula la producción de testosterona por encima de los niveles normales en los primeros 4 días para evolucionar a niveles de castración al final de las 4 semanas en todos los pacientes. Después no se ha observado efecto rebote como al inicio.

La seguridad de este tratamiento ha sido establecida en todos los estudios publicados. No se han registrado reacciones adversas en los análisis rutinarios de hematología y bioquímica en largos periodos de observación. El único efecto secundario mencionado ha sido el relacionado con las fluctuaciones de la testosterona sérica y su efecto secundario en el paciente y en la actividad biológica de su cáncer hormono-dependiente. Muchos pacientes declaran un descenso de la libido y ausencia de erección seguido de impotencia. Estos efectos sirven para confirmar la eficacia farmacológica de la droga. Se ha detectado que una parada accidental en la administración de la droga por falta de docilidad del paciente ó problemas técnicos con la inyección, resulta en un rebote de testosterona.

Los sofocos son parte de la esperada reacción clínica del paciente a la retirada de testosterona y se ha comunicado con una frecuencia del 50%<sup>101,102,106,107</sup>. Es infrecuente el dolor mamario.

Un efecto secundario de importancia clínica es el denominado "síndrome flare-up" en respuesta a un incremento brusco de la testosterona sérica en la fase estimuladora del tratamiento con agonistas LHRH en los días 1-3. Es sugerido que elevaciones de testosterona sérica pueden resultar en agravamientos objetivos y subjetivos de los síntomas. La atención a este problema fue despertada por la descripción del síndrome en la literatura científica<sup>108,109</sup> en casos clínicos únicos y por el conocimiento que la administración de testosterona exógena a pacientes con cáncer metastásico puede conducir a resultados desfavorables objetivos y subjetivos. En periodos previos de investigación clínica, la testosterona exógena fue dada a pacientes con cáncer prostático para detectar metástasis no sospechadas<sup>110</sup>, inducir tratamiento con fósforo radiactivo<sup>111</sup> ó tratamiento de inducción con quimioterapia<sup>112,113</sup>. Estos últimos esfuerzos terapéuticos fueron abandonados por los efectos secundarios provocados por la testosterona.

La gran mayoría de los efectos secundarios comprenden un incremento del dolor óseo durante las primeras semanas del tratamiento en 4-8% de los pacientes tratados. El "flare-up" bioquímico, una elevación relacionada de la fosfatasa ácida prostática no siempre está presente y algunas veces es contradictoria<sup>102,106,111</sup>.

En el 1% de los casos se han observado complicaciones amenazantes de la vida tales como compresión de la médula espinal u obstrucción ureteral ocurridos durante el primer mes del tratamiento. Es posible que en estos casos la enfermedad fuera hormono-resistente ó que la testosterona extra durante dos

semanas antes de que se suprimiera fuera suficiente para conseguir un volumen tumoral crítico. Es evidente que pacientes con enfermedad diseminada están expuestos a exacerbaciones clínicas y serían estrechamente monitorizados durante la terapia hasta que una remisión clínica clara fuera obtenida.

Muchos estudios multicéntricos reconocen el problema y añaden dietilestilbestrol, acetato de ciproterona, ketoconazol o flutamida a los agonistas LHRH al menos los primeros 14 días de tratamiento<sup>114,115,116,117</sup>. Esto parece eliminar el problema.

Derivan de la forma de aplicación, siendo excepcionales y consisten en un rash ocasional. Reacción local a la inyección se ha comunicado en menos de 1% de casos<sup>105</sup>.

## **HORMONORRESISTENCIA**

El cáncer de próstata hormonorresistente, hormonorefractario u hormono independiente se define como la enfermedad progresiva a pesar de niveles séricos de castración de la testosterona. El desarrollo de hormonorresistencia es predecible después de la deprivación androgénica. El tiempo medio de progresión es de 18 meses, con una supervivencia media de aproximadamente 6 meses, falleciendo más del 50% en el año siguiente, suponiendo un grupo de pacientes con un pronóstico muy pobre. En el seguimiento de la enfermedad en progresión algunas células que quedan sensibles a los andrógenos pueden responder a una segunda línea de tratamiento hormonal.

Los criterios para detectar la progresión son la aparición de una lesión mensurable bidimensionalmente; crecimiento o aumento del número de las

metástasis óseas; incremento del antígeno específico de próstata ó nuevos signos ó síntomas.

Un primer paso esencial para confirmar esta fase evolutiva de la enfermedad es demostrar que el paciente alcanza esta situación clínica con unas determinaciones sanguíneas de testosterona circulante que corresponden a los denominados niveles de castración. Esta imperativa observación tiene un doble fundamento: por un lado asegura que no existe incumplimiento terapéutico ó bien una situación previa de mala adaptación del paciente al tratamiento hormonal que venía siguiendo por su enfermedad, y por otra soslaya el efecto mitogénico de los eventuales andrógenos circulantes, los cuales poseen capacidad de estimulación del crecimiento tumoral incluso cuando estamos presenciando el crecimiento y progresión de la enfermedad en fase de hormonoindependencia. Por esta circunstancia, la supresión de los niveles de testosterona circulantes es necesaria incluso cuando se establece el concepto de enfermedad hormonoindependiente de la acción androgénica.

Desde el punto de vista clínico, es imprescindible constatar con criterios objetivos que existe progresión de la enfermedad en base a modificaciones observadas por la aparición de nuevas metástasis ó modificaciones en los síntomas del paciente evaluadas con las correspondientes escalas utilizadas para cuantificar la demanda de analgésicos, intensidad del dolor, calidad de vida, etc.. Esta consideración clínica debe referirse a un determinado periodo de tiempo de observación del paciente y se extiende a los últimos seis meses de su evolución; en la practica posee una gran validez, ya que permite ponderar con criterios estrictos la eventual decisión de modificar el esquema terapéutico del paciente y, de otra manera, conocida la frecuencia de empeoramientos clínicos transitorios de

estos pacientes, induciría a decisiones presididas por la precipitación. En la evaluación clínica de estos pacientes también es imprescindible considerar su estado general de salud, de tal manera que nos permita definir adecuadamente no sólo aquellas situaciones clínicas en las que la expectativa de vida se estime inferior a seis meses, sino también el estado general de salud del paciente (ECOG 0-2), que podría ser no tributario de determinadas manipulaciones terapéuticas bien por su toxicidad ó por su impacto en la calidad de vida. En estas situaciones es obvio que pueden plantearse exclusivamente los adecuados tratamientos de soporte y cuidados paliativos.

En relación al comportamiento del PSA en la fase evolutiva de enfermedad metastásica hormonoindependiente permite hacer dos consideraciones: la primera en relación con la propia definición del citado momento evolutivo y la segunda en referencia a la evaluación de la respuesta al tratamiento. Con respecto a la definición de progresión tumoral basada en el incremento del PSA sérico, se establece la necesidad de documentar que su valor se duplica con respecto a la determinación basal (incremento 50%), el cual, desde el punto de vista metodológico, deberá constatarse al menos en dos determinaciones sucesivas, separadas dos semanas como mínimo.

En la evaluación de la respuesta al tratamiento, la utilización de la determinación del PSA como indicador de eficacia terapéutica es creciente, y para algunos autores adquiere la categoría de ser la variable principal de respuesta con criterios de evaluación.

Conviene señalar que esta posición en la que el PSA se utiliza como variable de respuesta posee el atractivo de solventar algunos de los problemas más limitantes

de la investigación clínica en cáncer de próstata, como es la dificultad para identificar criterios objetivos medibles ó evaluables para valorar la respuesta, sin embargo, posee reconocidas limitaciones y las decisiones terapéuticas no deben apoyarse exclusivamente en este parámetro. En este sentido, cabe destacar que estas limitaciones están condicionadas por la propia heterogenicidad tumoral, la documentada disminución en la secreción de antígeno por los tumores indiferenciados y finalmente la evidencia de correlación variable que existe entre los cambios observados de PSA y otros parámetros de respuesta, tras observaciones efectuadas incluso en pacientes tratados con terapia hormonal de segunda línea.

Los criterios de la Clínica Puerta de Hierro de Madrid para terapia de investigación en carcinoma de próstata en fase evolutiva de independencia androgénica<sup>205</sup> son:

- Testosterona plasmática en niveles de castración.
- Expectativa de vida superior a 6 meses.
- Estado general de salud ECOG/WHO = 0-2 Karnofs 60%.
- Duplicación de las cifras de antígeno específico prostático con respecto a los valores basales.
- Evaluación del volumen tumoral (categoría de la enfermedad: O I, O II, V I, V II).
- Suspensión de la terapia con antiandrógenos al menos cuatro semanas antes del inicio de cualquier modificación terapéutica.

En estos pacientes el pronóstico y la conservación de la sensibilidad hormonal es heterogénea. En los pacientes con enfermedad ósea sintomática se han asociado diversos factores que empeoran el pronóstico: mal estado general, elevación de la fosfatasa alcalina, creatinina sérica anormal, y respuesta durante menos de 1 año a la terapia hormonal previa. El nivel absoluto de PSA en el momento de la iniciación de la terapia en la recaída no se ha determinado que tenga significación pronóstica

Cuando aparecen síntomas debido a la recurrencia local ó la enfermedad metastásica, uropatía obstructiva, disfunción miccional, compresión de la médula espinal, etc., está indicada una segunda línea de tratamiento.

La segunda línea de tratamiento puede ser la retirada de la flutamida, administración de flutamida ó altas dosis de bicalutamida aminoglutetimida, hidrocortisona, progesterona, ketoconazol, estracyt, mitoxantrone, liarozol, vimblastina, adriamicina, epirubicina, etopóxido, Taxol, ó combinaciones de estas terapias, algunas de las cuales se han debido suspender en ensayos clínicos debido a su excesiva toxicidad. No está definida una quimioterapia norma en estos casos.

La respuesta se ha determinado por la reducción de la enfermedad mensurable ó reducción del PSA, habiéndose obtenido con la quimioterapia rangos de respuesta del 40-50% y 40-80% respectivamente, aunque sin mejoría de la supervivencia. En pacientes en tratamiento con agonistas de la LHRH ó estrógenos como terapia de primera línea, con la testosterona en niveles de castración, se ha valorado si el mantenimiento del bloqueo androgénico supone alguna ventaja en la supervivencia, con resultados contradictorios según distintos autores.

## INTRODUCCIÓN.

---

El resultado de la segunda línea de tratamiento puede ser pronosticado por el PSA nadir. Si el PSA desciende a un nadir de  $<2$  ng/ml, el 5% progresará en los siguientes 8 meses. Si el PSA desciende a un nadir de 2-10 ng/ml, el 91% progresarán en ese mismo lapso de tiempo.



# **HIPOTESIS**

No se ha detectado la publicación hasta la actualidad, en la literatura revisada, del nivel de inhibina B en pacientes en tratamiento con agonistas LHRH por adenocarcinoma de próstata. Asumiendo el efecto de los agonistas LHRH sobre las gonadotropinas y los datos recogidos en la literatura científica sobre los niveles de inhibina B en situaciones de reducción en los niveles de gonadotropinas, se podrían esperar unos niveles séricos inferiores en los pacientes tratados con agonistas LHRH respecto a los niveles en individuos no sometidos a dicho tratamiento.

Una correlación inversa entre inhibina B y FSH ha sido comunicada en múltiples estudios en individuos sanos y en aquellos con diversas disfunciones gonadales. No se ha apreciado la misma en situaciones de hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático.

En los pacientes analizados en el presente estudio se espera apreciar una correlación negativa entre inhibina B y FSH en los pacientes controles. En los pacientes tratados con agonistas LHRH por adenocarcinoma de próstata no se ha valorado dicha correlación en la literatura que se ha revisado. Dada la alteración del eje hipotálamo-hipofisario-testicular por dicho tratamiento, con la presencia de hipogonadismo hipogonadotrópico secundario, la expectativa es de que no exista dicha correlación.

A la vista de los resultados publicados en la literatura científica, en donde se han expuesto los niveles de inhibina B en situaciones de reducción en los niveles en suero de las gonadotropinas, se plantea la hipótesis de que con el bloqueo androgénico, al disminuir los niveles de FSH, los niveles de inhibina B disminuyen en 80 pgr./ml., respecto a los controles con niveles de FSH normal.

En esta tesis doctoral se realiza un estudio descriptivo de los niveles de inhibina B en pacientes con cáncer de próstata tratados con agonistas LHRH y en otro grupo de pacientes no tratados.

Se exponen, asimismo, las modificaciones hormonales derivadas de dicho tratamiento en los niveles de FSH, LH, TSH , Prolactina ,Testosterona y Estradiol,.

Se valorará si aparece una correlación negativa entre FSH e Inhibina B, fundamento de la hipótesis de la inhibina en los pacientes en dicho tratamiento y en los controles no tratados.

Se ha realiza esta Tesis Doctoral en el intento de conocer información sobre el nivel de inhibina B en esta situación de alteración del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, observar la correlación de esta hormona con otras hipofisarias y gonadales en la misma y presentar los niveles de inhibina B en el tratamiento con agonistas LHRH.

# **OBJETIVOS**

### **Objetivo general.-**

- Conocer los niveles de Inhibina B en pacientes varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata, en tratamiento con bloqueo androgénico con agonistas LH-RH, con/sin antiandrógenos, sin antecedentes de alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento, comparándolos con los niveles en pacientes controles, varones adultos, no tratados, sin antecedentes de alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular.

### **Objetivos específicos.-**

- Conocer si hay correlación entre los niveles de inhibina B y las hormonas hipofisarias FSH, LH, PRL, TSH en los pacientes controles, varones adultos, no tratados, sin antecedentes de alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular.
- Conocer si hay correlación entre los niveles de inhibina B y las hormonas periféricas gonadales testosterona y estradiol en los pacientes controles, varones adultos, no tratados, sin antecedentes de alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular.
- Conocer si hay correlación entre los niveles de inhibina B y las hormonas hipofisarias FSH, LH, PRL, TSH en pacientes varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata, en tratamiento con bloqueo androgénico con agonistas LH-RH, con/sin antiandrógenos, sin antecedentes de alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento.

## OBJETIVOS

---

- Conocer si hay correlación entre los niveles de inhibina B y las hormonas periféricas gonadales testosterona y estradiol en pacientes varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata, en tratamiento con bloqueo androgénico con agonistas LH-RH, con/sin antiandrógenos, sin antecedentes de alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento.
- Conocer el ratio inhibina B/FSH en los pacientes controles, varones adultos, no tratados, sin antecedentes de alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, frente a pacientes varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata, en tratamiento con bloqueo androgénico con agonistas LH-RH, con/sin antiandrógenos, sin antecedentes de alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento.
- Conocer si hay correlación entre inhibina B y ratio inhibina B/FSH en los pacientes controles, varones adultos, no tratados, sin antecedentes de alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, y en los pacientes varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata, en tratamiento con bloqueo androgénico con agonistas LH-RH, con/sin antiandrógenos, sin antecedentes de alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento.
- Conocer si hay correlación en los niveles de inhibina B y el ratio inhibina B/FSH en los pacientes varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata, en tratamiento con bloqueo androgénico con agonistas LH-RH, con/sin antiandrógenos, sin antecedentes de alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento, con el nivel de PSA.

# **MATERIAL Y METODOS**

Hemos realizado un estudio decriptivo y transversal con recogida de muestras prospectiva durante el periodo de tiempo comprendido entre el 21 de julio de 1999 y 21 de junio de 2000. El análisis estadístico se finaliza el 23 de julio de 2001.

### **Diseño y Metodología**

Población de estudio diana:

Se establecen dos grupos de pacientes:

Grupo I) Varones, adultos, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad, ni del eje Hipotálamo-Hipófiso -Gonadal.

Grupo II) Varones, en tratamiento, durante más de 4 meses, con agonistas LH-RH con/sin antiandrógenos, por adenocarcinoma de próstata, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad, ni del eje Hipotálamo-Hipófiso – Gonadal antes de dicho tratamiento.

Población de estudio muestreado:

Grupo I.- 35 varones, adultos, que acuden a la consulta ó están ingresados en la planta del Servicio de Urología del Hospital General de Segovia por diversos motivos, siendo incluidos en el estudio de forma sucesiva. Criterios de inclusión: puedan aparearse por su edad con los pacientes del grupo II, sin antecedentes de alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, no padecimiento ni antecedentes de criptorquidia ni varicocele, exploración física negativa de hipogonadismo ó endocrinopatía.

Grupo II.- 35 varones diagnosticados de adenocarcinoma de próstata según consta en el archivo de Anatomía Patológica del Hospital General de Segovia, desde 1992 hasta la actualidad, siguiendo por este motivo tratamiento con



agonistas LH-RH con/sin antiandrógenos más de 4 meses. Criterios de inclusión: sin antecedentes de alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, no padecimiento ni antecedentes de criptorquidia ni varicocele, exploración física negativa de endocrinopatía.

Los pacientes se han apareado según su edad. El objeto del apareamiento es eliminar el posible sesgo de la edad en los resultados de las determinaciones hormonales.

Los pacientes de ambos grupos se aparearon por edad con objeto de eliminar el posible sesgo debido a diferencias de la misma.

### Tamaño muestral

Se justifica un tamaño muestral de 33 pacientes por grupo para una diferencia absoluta estimada de 80 pg./ml. menos en patológicos sometidos a bloqueo androgénico, según la literatura de 178 pgr/ml de inhibina B en el grupo control y 100 en el grupo patológico con una desviación estándar de 80 pgr/ml (alfa 0,05 y beta de 0,10).

### Cuaderno de recogida de datos y Definición de variables

A todos los pacientes se les realizó una historia clínica dirigida rellenando un cuaderno de recogida de datos con todas las variables que se exponen a continuación.

### **Datos de filiación:**

Nombre y apellidos, N° Historia Clínica Hospital General de Segovia, Edad, Fecha de nacimiento y Fecha del estudio.

### **Historia clínica:**

#### -Hijos propios:

-1: Si. Hijos naturales, no adoptados, ni resultado de técnicas de reproducción asistida con donante.

-2: No.

-Antecedentes de alteraciones de la fertilidad: Se considerara que existen cuando consten antecedentes de dificultad para la concepción por causa masculina. Cuando existan se anotará la causa. En caso contrario se considerará no antecedentes. En ningún caso se realizaron seminogramas a los pacientes.

-1: No antecedentes..

-2:Causa endocrina: enfermedad hipofisaria, hipogonadismo hipogonadotrófico aislado (Síndrome de Kallmann), síndrome del eunuco fértil, deficiencia aislada de FSH, síndromes congénitos (Prader-Willi, Lawrencw-Moon-Bardet-Biedl), exceso de andrógenos (deficiencia congénita de 21-hidroxilasa), exceso de estrógenos, prolactina ó glucocorticoides de cualquier causa, disfunción tiroidea (hipertiroidismo).

-3: Causada por anormalidades genéticas-cromosómicas: incluye el síndrome de Klinefelter, síndrome XYY, trastorno XX, síndrome de Noonan y otras alteraciones cromosómicas.

-4: Causa testicular no secundaria a enfermedades endocrinas: anorquia bilateral, criptorquidia de cualquier tipo operada ó no, varicocele uni-bilateral operado ó no,

síndrome de células de Sertoli exclusivamente, distrofia miotónica, anormalidades androgénicas (resistencia a los andrógenos), agentes gonadotóxicos (quimioterapia, radioterapia, fármacos), secundarias a enfermedades sistémicas (enfermedades febriles, uremia, cirrosis hepática, anemia falciforme), anormalidades estructurales de los espermatozoides, orquitis (por parotiditis, sífilis, gonorrea y lepra).

-5: Causa inmunológica.

-6: Idiopática.

-7: Causa obstructiva ductal: congénita ó adquirida por infecciones, estenosis ó vasectomía.

-8: Causada por problemas eyaculatorios: secundarios a RTU de próstata, cirugía del cuello vesical, linfadenectomía retroperitoneal, cirugía pelviana, neuropatía periférica diabética ó por esclerosis múltiple, fármacos simpaticolíticos.

-Enfermedad, tratamiento y exposición a gonadotóxicos en la actualidad: Se consideraran las enfermedades gonadales, endocrinas ó crónicas que pueden afectar al eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, ó agudas febriles, que estén diagnosticadas en la actualidad, independientemente de su severidad y tratamiento, y también tratamiento ó exposición a agentes gonadotóxicos ó fármacos que afecten la fertilidad. Si no se padeciera ninguna enfermedad de las incluidas, ni hubiera exposición a gonadotóxicos, ni tratamiento que alterara la fertilidad se anotará no.

-1: No.

-2: Enfermedad gonadal: incluye criptorquidia ó varicocele de cualquier tipo, orquiepididimitis infecciosa, traumatismo testicular, neoplasia, atrofia testicular

por cualquier causa, neoplasia testicular, enfermedades congénitas, anorquia, síndrome de células de Sertoli, anormalidades androgénicas.

-3: Enfermedad endocrina: incluye disfunción hipofisaria, tiroidea ó suprarrenal de cualquier tipo, síndromes congénitos (Prader-Willi, Laurence-Moon-Bardet-Biedl), exceso de estrógenos ó prolactina y diabetes mellitus, cualquier tipo y tratamiento.

-4: Enfermedad crónica: incluye uremia, parotiditis, HIV positivo, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, anorexia nerviosa, obesidad, EPOC, asma, apnea del sueño, artritis reumatoide, lepra, cirrosis hepática, anemia falciforme, hemocromatosis, epilepsia, distrofia miotónica, síndrome de Kennedy, lupus eritematoso sistémico, neoplasia de cualquier origen, TBC, anormalidades genéticas (síndrome de Klinefelter, síndrome XYY, trastorno XX, síndrome de Noonan y otras alteraciones cromosómicas relacionadas).

-5: Enfermedad aguda febril de cualquier causa.

-6: Exposición a gonadotóxicos: incluye quimioterapia y radioterapia.

-7: Exposición a fármacos y otras sustancias en cualquier grado: incluyen nitrofurantoina, sulfasalazina, cocaína, nicotina, marihuana, cafeína, plomo, arsénico, alcohol, antidepresivos tricíclicos, benzodiazepinas, antipsicóticos, antihipertensivos, opiáceos, espironolactona, ketoconazol, azatioprina, glucocorticoides e insecticidas.

-Exploración física: Se valorará el hábito corporal, las proporciones talla/braza, relaciones entre segmento superior y segmento inferior, cantidad y distribución del vello y de la grasa, estado nutricional y presencia de telangiectasias malares, exoftalmos y bocio. Si se sospecha la existencia de hipogonadismo prepuberal ó precoz, ó endocrinopatía se señalará. Los testículos se medirán con un "pie de

rey" apuntando los diámetros principales longitudinal y transverso en cm. y se dividirán por dos para obtener los radios "R" y "r" de un ovoide, obteniendo el volumen en ml según tabla de referencia, y, cuando el volumen sea inferior a valores inferiores de la tabla, se aplicará la fórmula  $\pi/6 \times L \times l$  donde "L" y "l" son los diámetros principales del testículo. La suma de los valores volumétricos de ambos testículos se conoce como Volumen Testicular Total (VTT). La consistencia de los testículos la definirá un único observador de forma subjetiva en normal o anormal, disminuida ó aumentada. Se valorará la presencia de varicocele, hidrocele y criptorquidia. El tamaño del pene se medirá en flaccidez, en línea recta desde la punta del glande hasta el arranque visual del pene. Se anotará la medida en cm..

- Tratamiento con bloqueo androgénico: si no siguiera tratamiento ni le ha tenido nunca se apuntará no. Si le sigue en la actualidad se apuntará meses de tratamiento y tipo. Como agonista LHRH podrá ser Acetato de Triptorelina mensual ó trimestral, Acetato de Goserelina mensual ó trimestral, Acetato de Leuprolide mensual ó Trimestral, ó Acetato de Buserelina nasal ó bimensual. Como antiandrógeno se incluyen Flutamida, Bicalutamida, Acetato de Ciproterona ó Fosfato de Estramustina

### Normativa ética para la Investigación

El estudio se ha regido por la normativa de la declaración de Helsinki y la ley de protección de datos. Se entregó un consentimiento informado a todos los pacientes que se incluyeron en el estudio.

### Consentimiento informado para pacientes participantes en el estudio

1) El objetivo del estudio es describir los niveles de determinadas hormonas en el suero de pacientes en tratamiento con bloqueo androgénico.

- 2) Se determina el nivel en sangre de las hormonas elegidas a un grupo de pacientes con dicho tratamiento por su enfermedad prostática, y a otro grupo que no están diagnosticados, ni tratados de esa enfermedad , comparando ambos resultados.
- 3) No será administrado, por motivo del estudio, ningún tratamiento adicional.
- 4) El beneficio esperado del estudio consiste en valorar la utilidad de dichos análisis para otros pacientes en el futuro.
- 5) Las incomodidades de la participación en el estudio incluyen:
  - Responder unas preguntas sobre función de los testículos y sobre enfermedades que los pueden afectar, y ser explorados los genitales durante la consulta de Urología.
  - Realizarse un análisis de sangre para determinar el nivel de las hormonas elegidas, además de los que se precisen por los motivos de la consulta a Urología.
- 6) No se esperan acontecimientos adversos por la participación en el estudio.
- 7) No se conocen otras alternativas posibles para conseguir los objetivos del estudio.
- 8) La participación es voluntaria. La no participación no supone ningún perjuicio.
- 9) Los datos obtenidos del estudio serán conocidos sólo por el equipo investigador, serán confidenciales y, si se publican en revistas científicas ó se exponen en foros científicos, se mantendrá el anonimato de los participantes.
- 10) La participación en el estudio no tiene compensación económica.
- 11) El investigador responsable del estudio es el Dr. Alfonso Diego García, que informará y contestará dudas y preguntas de los participantes. Estos podrán contactar con el en el Servicio de Urología del Hospital General de Segovia.

**CONSENTIMIENTO:** TITULO DEL ESTUDIO: “ Estudio hormonal de pacientes en tratamiento con bloqueo androgénico”.

Yo.....

He leído la información sobre este estudio, que se me ha entregado. He podido hacer preguntas y he recibido suficiente información sobre el mismo. He hablado con el Dr. Alfonso Diego García y comprendo que mi participación es voluntaria. Comprendo que puedo rehusar participar en el estudio sin dar explicaciones sin que ello me suponga ningún perjuicio. Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha.-.....

Firma participante.-.....

### **Determinaciones séricas:**

Las muestras sanguíneas se han extraído entre las 10 y las 13 horas, e inmediatamente fueron centrifugadas a 3000 revoluciones por minuto durante 5 minutos. Se realizaron 2-3 alicuotas de las que se obtuvieron suero para las determinaciones bioquímicas y el resto se congeló a  $-80^{\circ}$  C y permaneció almacenado hasta su descongelamiento para las determinaciones hormonales según las técnicas que se describirán en otro apartado.

El tiempo en meses en que las muestras de suero estuvieron congeladas a  $-80^{\circ}$  C hasta la realización de las determinaciones hormonales osciló entre 1 y 12 meses; media 6,84; desviación estándar 3,37. En el grupo II el tiempo de congelamiento varió entre 1 y 11 meses; media 7,34 meses; desviación estándar 3,01; mediana 8. En el grupo I dichos valores comprendieron el intervalo entre 1 y 12 meses; media 6,84 meses; desviación estándar 3,37; mediana 8.

### **Determinaciones bioquímicas:**

Se determinarán en autoanalizador HITACHI 917.

-1: Colesterol: Se utilizará el Método Colesterol Oxidosa Paraaminofenazona (CHOD-PAP). Los resultados se indican en miligramos por decilitro (mg/dl.).

Rango normal: 50-200

-2: Creatinina : Se utilizará el Método picrato alcalino (Método cinético). Los resultados se indican en miligramos por decilitro (mg/dl.). Rango normal: 0,6-1,1

-3: Glucosa: Se utilizará el Método Glucosa Oxidasa Paraaminofenazona (GOD-PAP). Los resultados se indican en miligramos por decilitro (mg/dl.). Rango normal: 75-110

-4: Proteínas totales: Se utilizará el Método Biuret. Los resultados se indican en gramos por decilitro (g/dl.). Rango normal: 6,0-8,0

-5: Transaminasa Glutámicooxalacética (GOT): Se utilizará el Método UV de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC). Los resultados se indican en Unidades por litro (U/l.). Rango normal: 0-38

### **Determinaciones Hormonales**

Las determinaciones de TSH, FSH, LH, Prolactina, Estradiol y Testosterona total se realizaron mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA®) concebido para su uso en los analizadores automáticos ELECSYS 1010 y 2010 de ROCHE DIAGNOSTICA. Se utilizó el analizador automático ELECSYS 2010. Los ensayos se realizaron en el Hospital General de Segovia siguiendo las técnicas que se describirán a continuación y las instrucciones del fabricante.



La determinación de Inhibina B se realizó según la técnica que se describe en los Laboratorios UNILABS de Madrid. **Anexo I.** El transporte de las muestras de suero congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  desde el Hospital General de Segovia hasta los Laboratorios UNILABS de Madrid se efectuó en hielo seco por personal cualificado (Transportes World Courier de España S.A.).

### **Determinaciones hormonales por técnica ECLIA.**

La técnica tiene en común en todas las hormonas los siguientes aspectos:

Medidas de precaución y advertencias.- Sólo para diagnóstico in vitro. Observar medidas de precaución habituales para manipular reactivos.

Preparación de los reactivos.- Los reactivos incluidos en el estuche están listos para el uso y forman una unidad inseparable. Toda la información necesaria para el correcto funcionamiento se introduce automáticamente en el analizador a través del código de barras del reactivo.

Conservación y estabilidad.- Conservación a  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Mantener el estuche FSH Elecsys Reactivos en posición vertical para asegurar la biodisponibilidad de todas las micropartículas durante la mezcla automática antes del uso.

Estabilidad: En frasco cerrado a  $2-8^{\circ}\text{C}$  hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abierto, a  $2-8^{\circ}\text{C}$ , 12 semanas. En el Elecsys 2010, 8 semanas. En el Elecsys 1010, 4 semanas (conservación opcional en nevera y en el analizador con temperatura ambiente de  $20-25^{\circ}\text{C}$ , una vez abierto, máximo 20 horas en total).

Realización del test.- Para asegurar el funcionamiento correcto del test, observe las instrucciones de uso del analizador utilizado y compruebe si éste está equipado con todo el material necesario para realizar los tests.

La mezcla de las micropartículas que precede a su uso, así como la introducción de los parámetros a través del código de barras impreso sobre el reactivo se efectúan automáticamente. Por lo tanto, no se requieren pasos manuales. Pero si, excepcionalmente, el analizador no pudiera leer el código de barras, el código numérico de 15 cifras deberá introducirse manualmente.

Elecsys 2010: Antes del uso atemperar los reactivos refrigerados a 20°C aprox. y colocarlos en el rotor de reactivos del analizador (20°C) evitando formación de espuma. El analizador atempera, abre y tapa los frascos automáticamente.

Elecsys 1010: Atemperar los reactivos refrigerados a aprox. 20-25° C y colocarlos en el rotor de muestras/reactivos del analizador (temperatura ambiente 20-25° C) evitando la formación de espuma. Abrir los frascos antes del uso y cerrarlos inmediatamente después. Guardar los frascos en nevera después del uso.

Control de calidad.- PreciControl Universal 1 y 2 Elecsys y otros controles apropiados.

Los controles de los diferentes intervalos de concentración deberían efectuarse junto con el test en determinaciones simples por lo menos una vez cada 24 horas y siempre que se realice una calibración. Los intervalos del control tienen que adaptarse a las necesidades individuales del laboratorio. Los resultados deben hallarse dentro de los intervalos definidos. Cada laboratorio debería establecer sus propios factores de corrección en caso de valores fuera del intervalo indicado.

### Ensayo FSH-Hormona Foliculoestimulante

#### **Función.-**

Test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de la hormona foliculoestimulante en suero y plasma humanos.

#### **Características.-**

La FSH (hormona foliculoestimulante) pertenece junto a la LH (hormona luteinizante) a las gonadotropinas. Ambas regulan y estimulan de manera sinérgica el crecimiento y la función de las gónadas (ovarios y testículos) .

La FSH, al igual que las LH, TSH y HCG, es una glucoproteína que consta de dos subunidades (cadenas alfa y beta) de peso molecular aproximadamente 32000 D.

La FSH y la LH son liberadas de manera pulsátil de las células gonotropas de la hipófisis anterior. El nivel de las hormonas circulantes queda regulado por hormonas esteroideas a través de una retroacción negativa sobre el hipotálamo. En los varones, la FSH induce el desarrollo de espermatogonios.

La determinación de FSH sirve para el reconocimiento de trastornos funcionales dentro del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.

El test FSH Elecsys emplea dos diferentes anticuerpos monoclonales específicamente dirigidos contra FSH humana. La reactividad cruzada con LH, TSH, HCG, HPL es tan mínima que puede ignorarse.

### **Principio del test.-**

Técnica sandwich con una duración total de 18 minutos.

- 1ª incubación: 40 microlitros de muestra, un anticuerpo monoclonal biotinilado específico contra FSH y un anticuerpo monoclonal específico contra FSH marcado con quelato de rutenio (Quelato Tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II) (Ru(bpy)<sub>2+3</sub>) forman un complejo sandwich.
- 2ª incubación: Después de la incorporación de micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por la interacción entre biotina y estreptavidina.
- La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.
- Los resultados se obtienen a partir de una curva de calibración realizada en el sistema mediante una calibración a dos puntos y una curva master incluida en el código de barras del reactivo.

### **Reactivos, contenido y concentraciones.-**

FSH, Elecsys estuche de reactivos, 100 tests.

M Micropartículas recubiertas de estreptavidina (tapón transparente), 1 frasco, 6,5 ml:

Micropartículas recubiertas de estreptavidina: 0.72 mg/ml, capacidad de fijación: 470 ng de biotina/mg de micropartículas; conservante.

R1 Anticuerpo anti-FSH-biotina (tapón gris), 1 frasco, 10 ml.: anticuerpo anti-FSH monoclonal-biotina (ratón) 2.0 mg/l; tampón MES 50 mmol/l, ph 6.0; conservante.

R2 Anticuerpo anti-FSH-RU(bpy)<sub>2+3</sub> (tapón negro), 1 frasco, 10 ml: Anticuerpo anti-FSH monoclonal (ratón) marcado con quelato de Rutenio 0.8 mg/l; tampón MES 50 mmol/l, ph 6.0; conservante.

### **Obtención y preparación de las muestras.-**

Suero recogido en tubos estándar de muestra ó tubos conteniendo gel de separación. Plasma con heparina (NH<sub>4</sub>, Li, Na) y K<sub>3</sub> EDTA. Al emplear citrato sódico los resultados obtenidos son 20% más bajos que en suero. Estabilidad: 14 días a 2-8° C , 6 meses a -20°C (7,8 de FSH). Congelar una sola vez. Estabilidad del suero recogido en tubos con gel de separación de 48 horas a 2-8° C. Muestras conteniendo precipitado deben centrifugarse antes de realizar el test. No emplear muestras inactivadas por calor.

### **FSH Elecsys Procedimiento.-**

Material suministrado. FSH Elecsys estuche de reactivos para 100 tests contiene:

- M Micropartículas recubiertas de estreptavidina.
- R1 Anticuerpo anti.FSH-biotina.
- R2 Anticuerpo anti-FSH-Ru(bpy)<sub>2+3</sub>.

Adicionalmente (no suministrado)

- FSH calset Elecsys para 10 calibraciones
- Precicontrol Universal Elecsys,. Para 2\*3 ml de Precicontrol Universal 1 y 2.
- Elecsys 1010 ó 2010
- ProCell Elecsys, 6x380 ml de tampón de sistema
- CleanCellElecsys , 6x380 ml de solución detergente para la célula de lectura
- Assay Cup Elecsys 1010, 12x32 tubos de ensayo ó Assay Cup Elecsys 2010, 60x60 tubos de ensayo
- Assay Tip Elecsys 2010, 30x120 puntas de pipeta
- Equipo de laboratorio usual.

### **Calibradores.-**

El test FSH Elecsys ha sido calibrado frente al Enzymun-Test FSH que, a su vez, ha sido calibrado mediante el 2º estandar de referencia de la OMS IRP 78/549.

Cada reactivo de FSH contiene un código de barras que incluye la información necesaria para la calibración del lote de reactivos. La curva master preestablecida es adaptada al analizador a través de FSH CalSet Elecsys.

Intervalo de calibraciones: Efectuar la calibración una vez por lote con reactivos recién colocados en el analizador (como máximo 24 horas). Se recomienda calibrar el Elecsys 2010 después de 1 mes si se trata del mismo lote de reactivos y después de 7 días al emplear el mismo estuche de reactivos en los analizadores. El

Elecsys 1010 con cada estuche de reactivos, al cabo de 7 días a temperatura ambiente de 20-25 °C, y al cabo de 3 días a temperatura ambiente 25-32°C. Para ambos analizadores, en caso necesario, por ejemplo en control de calidad fuera del intervalo indicado.

Verificación de la calibración: no es necesaria pues el software del analizador comprueba automáticamente la validez de la curva e indica eventuales desviaciones.

### **Cálculo.-**

Los Elecsys 1010 y 2010 calculan automáticamente la concentración de FSH de cada muestra. Los resultados se indican en mUI/ml.

### **Limitaciones del análisis - interferencias .-**

El test no se ve afectado por ictericia (bilirrubina <64 mg/dl), hemólisis (Hb <1 g/dl), lipemia (Intralipid < 1900 mg/dl), biotina < 60 ng/ml (criterio: recuperación +- 10% del valor inicial).

En pacientes en tratamiento con altas dosis de biotina (> 5 mg/día), la extracción de la muestra debería efectuarse no antes de 8 horas tras la última administración de biotina.

No se han observado interferencias por factores reumatoides hasta 7000 U/ml.

Sin efecto High-Dose-Hook con concentraciones de FSH hasta 2000 mUI/ml. Se han analizado in vitro 17 fármacos de uso frecuente y no se han observado interferencias.

Este test, al igual que todos los tests que contienen anticuerpos monoclonales de ratón, puede dar resultados falsos con muestras de pacientes en tratamientos con dichos anticuerpos. El test FSH Elecsys contiene aditivos que minimizan tales influencias. En casos muy raros pueden producirse interferencias por títulos extremadamente altos de anticuerpos contra la estreptavidina.

Para el diagnóstico, los resultados de FSH Elecsys siempre deben interpretarse teniendo en cuenta la anamnesis del paciente, el análisis clínico así como el resultado de otros exámenes.

### **Intervalo de medición.-**

0.100-200.0 mUI/ml (definido por el límite de detección y el máximo de la curva master). Valores inferiores al límite de detección se indican como  $< 0.100$  y los superiores como  $\geq 200.0$  nUI/ml.

### **Dilución de las muestras.-**

Gracias al amplio intervalo de medición no se requiere ninguna dilución.

### **Intervalo de referencia en varones .-**

n: 319 Percentiles: **50**: 4.6 mUI/ml; **5**: 1.5 mUI/ml; **95**: 12.4 mUI/ml

Cada laboratorio debería comprobar si los intervalos de referencia pueden aplicarse a su grupo de pacientes, y, en caso necesario, establecer sus propios valores.



**Características del test.**

**Precisión.-**

La reproductibilidad ha sido determinada mediante reactivos Elecsys, un pool de suero humano y de controles según un protocolo modificado (EP5-T) del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards): 6 veces por día en el plazo de 10 días (n:60) con los resultados siguientes

Muestra	VM mUI/ml	Precisión intraensayo		Precisión total	
		DE mUI/ml	%CV	DE mUI/ml	%CV
Suero humano 1	1.2	0.02	1.8	0.06	5.3
Suero humano 2	50.4	0.74	1.5	1.90	3.8
Suero humano 3	103.0	1.85	1.8	5.24	5.1
PreciControl U1	11.1	0.22	2.0	0.41	3.7
PreciControl U2	28.9	0.40	1.4	0.85	2.9

**VM: Valor medio**

**DE: Desviación estándar**

**CV: Coeficiente de variación**

**Sensibilidad analítica (límite de detección inferior).-**

< 0.10 mUI/ml. El límite de detección equivale a la concentración mínima medible de FSH que puede distinguirse de cero. Se calcula como la concentración situada a dos desviaciones estandar superiores al estándar más bajo. (calibrador master, Std. 1+2 DE, precisión intraensayo, n =21).

**Especificidad analítica.-**

Para los anticuerpos monoclonales empleados se han obtenido las siguientes reacciones cruzadas: LH, TSH, hCG, y hPL < 0.1%.

**Comparación de métodos.-**

Una comparación del método FSH Elecsys con el Enzymun-Test FSH (x) basada en un colectivo de pacientes clínicos ha dado las siguientes correlaciones:

Número de muestras medidas: 160.

Passing/Bablok (9-11 de FSH) Regresión lineal

$$Y = 0.213 + 1.093x$$

$$y = 0.114 + 1.098x$$

$$R = 0.998$$

$$r = 0.998$$

$$DE(dm68)=0.504$$

$$Sy.x= 1.552$$

Concentraciones de las muestras: entre aprox. 0.65 y 152 mUI/ml

### 1.1 Ensayo LH-Hormona Luteinizante

#### **Función.-**

Test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de la hormona luteinizante en suero y plasma humanos

#### **Características.-**

La LH (hormona luteinizante) pertenece junto a la FSH (hormona foliculoestimulante) a las gonadotropinas. Ambas hormonas regulan y estimulan de forma sinérgica el crecimiento y función de las gónadas (ovarios y testículos) .

La LH, al igual que las FSH, TSH y HCG, es una glucoproteína que consta de dos subunidades (cadenas alfa y beta). Esta proteohormona, compuesta de 121 aminoácidos y tres cadenas de azúcar, tiene un peso molecular de 29500 D (3 de FSH).

La LH y la FSH son liberadas de manera pulsátil de las células gondotropas de la hipófisis anterior. El nivel de las hormonas circulantes queda regulado por hormonas esteroides a través de una retroacción negativa sobre el hipotálamo. En la célula de Leydig del testículo, la LH estimula la producción de testosterona.

La determinación de LH sirve para el reconocimiento de trastornos funcionales dentro del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. La determinación de LH junto con la FSH está indicada sospecha de insuficiencia de las células de Leydig.

Con el test LH Elecsys se reconocen todos los tipos de LH mencionados en la literatura. Los anticuerpos específicos empleados pueden reconocer la conformación, es decir, el anticuerpo biotilado reconoce el epítipo construido

por las dos subunidades y el anticuerpo marcado con quelato de Rutenio reconoce un epítoto que se halla en la subunidad beta. Por esto la reactividad cruzada con FSH, TSH, HCG, HGH y HPL es tan mínima que puede ignorarse.

### **Principio del test.-**

En la 1ª incubación se utilizan 20 microlitros de muestra. Los restantes puntos del principio del test son los mismos que los del principio del test de FSH.

### **Reactivos - contenido y concentraciones.-**

LH, Elecsys estuche de reactivos, 100 tests

M Micropartículas recubiertas de estreptavidina (tapón transparente), 1 frasco, 6,5 ml:

Micropartículas recubiertas de estreptavidina: 0.72 mg/ml, capacidad de fijación: 470 ng de biotina/mg de micropartículas; conservante.

R1 Anticuerpo anti-LH-biotina (tapón gris), 1 frasco, 10 ml.: anticuerpo anti-LH monoclonal-biotina (ratón) 2.0 mg/l; tampón Tris 50 mmol/l, ph 8.0; conservante.

R2 Anticuerpo anti-LH-RU(bpy)<sub>2+3</sub> (tapón negro), 1 frasco, 10 ml: Anticuerpo anti-LH monoclonal (ratón) marcado con quelato de Rutenio 0.3 mg/l; tampón Tris 50 mmol/l, ph 8.0; conservante.

### **Obtención y preparación de las muestras.-**

Suero recogido en tubos estándar de muestra ó tubos conteniendo gel de separación. Plasma con heparina (NH<sub>4</sub>, Li, Na) y K<sub>3</sub> EDTA y fluoruro sódico/oxalato potásico. Al emplear citrato sódico los resultados deben corregirse

adicionándolos un 10%. Estabilidad: 14 días a 2-8° C , 6 meses a -20°C . Congelar una sola vez. Estabilidad del suero recogido en tubos con gel de separación observar las indicaciones del fabricante. Muestras conteniendo precipitado deben centrifugarse antes de realizar el test. No emplear muestras inactivadas por calor.

### **LH Elecsys Procedimiento.-**

Material suministrado. LH Elecsys estuche de reactivos para 100 tests contiene:

- M Micropartículas recubiertas de estreptavidina.
- R1 Anticuerpo anti-LH-biotina.
- R2 Anticuerpo anti-LH-Ru(bpy)<sub>2</sub>+3.

Adicionalmente (no suministrado)

- LH CalSet Elecsys para 10 calibraciones
- PreciControl Universal Elecsys,. Para 2x3 ml de Precicontrol Universal 1 y 2.
- Elecsys 1010 ó 2010
- ProCell Elecsys, 6x380 ml de tampón de sistema
- CleanCellElecsys , 6x380 ml de solución detergente para la célula de lectura
- Assay Cup Elecsys 1010, 12x32 tubos de ensayo ó Assay Cup Elecsys 2010, 60x60 tubos de ensayo
- Assay Tip Elecsys 2010, 30x120 puntas de pipeta
- Equipo de laboratorio usual.

### **Calibradores.-**

El test LH Elecsys ha sido calibrado frente al 2º estandar internacional (NIBSC) 80/552

Cada reactivo de LH contiene un código de barras que incluye la información necesaria para la calibración del lote de reactivos. La curva master preestablecida es adaptada al analizador a través de LH CalSet Elecsys.

Intervalo de calibraciones: Efectuar la calibración una vez por lote con reactivos recién colocados en el analizador (como máximo 24 horas). Se recomienda calibrar el Elecsys 2010 después de 1 mes si se trata del mismo lote de reactivos y después de 7 días al emplear el mismo estuche de reactivos en los analizadores. El Elecsys 1010 con cada estuche de reactivos, al cabo de 7 días a temperatura ambiente de 20-25 °C, y al cabo de 3 días a temperatura ambiente 25-32°C. Para ambos analizadores, en caso necesario, por ejemplo en control de calidad fuera del intervalo indicado.

Verificación de la calibración: no es necesaria pues el software del analizador comprueba automáticamente la validez de la curva e indica eventuales desviaciones.

### **Cálculo.-**

Igual que para el test de FSH.

### **Limitaciones del análisis - interferencias.-**

El test no se ve afectado por ictericia (bilirrubina <66 mg/dl), hemólisis (Hb <1 g/dl), lipemia (Intralipid < 1900 mg/dl), biotina < 50 ng/ml (criterio: recuperación +- 10% del valor inicial).

En pacientes en tratamiento con altas dosis de biotina (>5 mg/día), la extracción de la muestra debería efectuarse no antes de 8 horas tras la última administración de biotina.

No se han observado interferencias por factores reumatoides hasta 1500 U/ml.

Sin efecto High-Dose-Hook con concentraciones de LH hasta 1200 mUI/ml.

Se han analizado in vitro 17 fármacos de uso frecuente y no se han observado interferencias.

Este test, al igual que todos los tests que contienen anticuerpos monoclonales de ratón, puede dar resultados falsos con muestras de pacientes en tratamientos con dichos anticuerpos. El test LH Elecsys contiene aditivos que minimizan tales influencias. En casos muy raros pueden producirse interferencias por títulos extremadamente altos de anticuerpos contra la estreptavidina.

Para el diagnóstico, los resultados de LH Elecsys siempre deben interpretarse teniendo en cuenta la anamnesis del paciente, el análisis clínico, así como el resultado de otros exámenes.

### **Intervalo de medición.-**

Igual que para el test de FSH.

**Dilución de las muestras.-**

Igual que para el test de FSH.

**Intervalo de referencia en varones .-**

n: 322 Percentiles: **50**: 4.0 mUI/ml; **5**: 1.7 mUI/ml; **95**: 8.6 mUI/ml

Cada laboratorio debería comprobar si los intervalos de referencia pueden aplicarse a su grupo de pacientes, y, en caso necesario, establecer sus propios valores.

**Características del test.**

**Precisión .-**

La reproductibilidad ha sido determinada mediante reactivos Elecsys, un pool de suero humano y de controles según un protocolo modificado (EP5-T) del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards): 6 veces por día en el plazo de 10 días (n=60) con los resultados siguientes

Muestra	VM mUI/ml	Precisión intraensayo		Precisión total	
		DE mUI/ml	%CV	DE mUI/ml	%CV
Suero humano 1	0.54	0.01	1.8	0.03	5.2
Suero humano 2	27.19	0.21	0.8	0.54	2.0
Suero humano 3	50.72	0.41	0.8	1.01	2.0
PreciControl U I	9.38	0.11	1.1	0.19	2.0
PreciControl U II	44.82	0.42	0.9	0.83	1.9



**Sensibilidad analítica (límite de detección inferior).-**

0.10 mUI/ml. El límite de detección equivale a la concentración mínima medible de LH que puede distinguirse de cero. Se calcula como la concentración situada a dos desviaciones estandar superiores al estándar más bajo. (calibrador master, Std. 1+2 DE, precisión intraensayo, n =21).

**Especificidad analítica.-**

Igual que para el test de FSH.

**Comparación de métodos.-**

Una comparación del método LH Elecsys (y) con el Enzymun-Test LH (x) basada en un colectivo de pacientes clínicos ha dado las siguientes correlaciones:

Número de muestras medidas: 166.

Passing/Bablok (10-12 de LH) Regresión lineal

$$Y = -0.46 + 1.09x$$

$$y = -0.80 + 1.14x$$

$$R = 0.99$$

$$r = 0.99$$

$$DE(dm68)=1.073$$

$$Sy.x= 1.718$$

Concentraciones de las muestras: entre aprox. 1.3 y 123 mUI/ml

### ENSAYO PROLACTINA

#### **Función**

Test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de la prolactina en suero y plasma humanos.

#### **Características**

La prolactina se sintetiza en la hipófisis anterior y es secretada de forma pulsátil. Se trata de una hormona compuesta por 198 aminoácidos con un peso molecular de aprox. 22-23 Dalton. La prolactina se encuentra en el suero en 3 formas diferentes. Su forma monómera e inmunobiológicamente activa ("little") constituye aprox. El 80%, la forma dímera ("big") -biológicamente inactiva- representa el 5-20%, mientras que la forma tetramérica ("big-big") -con baja actividad biológica-, el 0.5-5% . El órgano diana de la prolactina es la glándula mamaria, cuyo desarrollo y diferenciación estimula. Altas concentraciones de prolactina inhiben la génesis esteroide de los ovarios, así como la producción y secreción de las gonadotropinas hipofisarias.

El test Elecsys Prolactina utiliza dos anticuerpos monoclonales específicamente dirigidos contra la prolactina humana. El anticuerpo biotinilado contenido en el reactivo 1 reconoce el extremo N-terminal de la prolactina mientras que el anticuerpo marcado con quelato de rutenio contenido en el reactivo 2 reacciona probablemente con una región de la zona intermedia de la molécula de prolactina .

### **Principio del test**

Se utilizan 10 microlitros de muestra en la primera incubación. Los puntos restantes del principio del test son iguales que para el test de FSH.

### **Reactivos - contenido y concentraciones**

Prolactina, Elecsys estuche de reactivos, 100 tests

M Micropartículas recubiertas de estreptavidina (tapón transparente), 1 frasco, 6,5 ml:

Micropartículas recubiertas de estreptavidina: 0.72 mg/ml,

capacidad de fijación: 470 ng de biotina/mg de micropartículas; conservante.

R1 Anticuerpo anti-Prolactina-biotina (tapón gris), 1 frasco, 10 ml.: anticuerpo anti-Prolactina monoclonal-biotina (ratón) 1.6 mg/l; tampón fosfato 50 mmol/l, ph 7.0; conservante.

R2 Anticuerpo anti-Prolactina-RU(bpy)<sub>2</sub>+<sub>3</sub> (tapón negro), 1 frasco, 10 ml: Anticuerpo anti-Prolactina monoclonal (ratón) marcado con quelato de Rutenio 0.3 mg/l; tampón fosfato 50 mmol/l, ph 7.0; conservante.

### **Obtención y preparación de las muestras**

Suero recogido en tubos estándar de muestra ó tubos conteniendo gel de separación.

Plasma con heparina (NH<sub>4</sub>, Li, Na) heparina, K<sub>3</sub>-EDTA, citrato sódico, fluoruro sódico/oxalato potásico. Al emplear plasma con citrato sódico y fluoruro sódico/oxalato potásico los resultados deben corregirse adicionándolos un 10%.

Estabilidad: 14 días a 2-8° C, 6 meses a -20°C. Congelar una sola vez . Estabilidad del suero recogido en tubos con gel de separación: 48 horas a 2-8°C (observar las indicaciones del fabricante). Muestras conteniendo precipitado deben centrifugarse antes de realizar el test. No emplear muestras inactivadas por calor.

### **Prolactina Elecsys Procedimiento**

Material suministrado: Prolactina Elecsys estuche de reactivos para 100 tests contiene:

- M Micropartículas recubiertas de estreptavidina.
- R1 Anticuerpo anti-prolactina-biotina.
- R2 Anticuerpo anti-prolactina-Ru(bpy)<sub>2</sub>+3.

Adicionalmente (no suministrado)

- Prolactina CalSet Elecsys para 10 calibraciones
- PreciControl Universal Elecsys. Para 2x3 ml de Precicontrol Universal 1 y 2.
- Diluent Universal Elecsys, 2x18 ml de diluyente para muestras
- Elecsys 1010 ó 2010
- ProCell Elecsys, 6x380 ml de tampón de sistema
- CleanCellElecsys , 6x380 ml de solución detergente para la célula de lectura
- Assay Cup Elecsys 1010, 12x32 tubos de ensayo ó Assay Cup Elecsys 2010, 60x60 tubos de ensayo

- Assay Tip Elecsys 2010, 30x120 puntas de pipeta
- Equipo de laboratorio usual.

### **Calibradores**

El test Prolactina Elecsys ha sido calibrado mediante el 3° estandar de referencia IRP 84/500 de la OMS . Cada reactivo de prolactina contiene un código de barras que incluye la información necesaria para la calibración del lote de reactivos. La curva master preestablecida es adaptada al analizador a través de Prolactin CalSet Elecsys.

Intervalo de calibraciones: Efectuar la calibración una vez por lote con reactivos recién colocados en el analizador (como máximo 24 horas). Se recomienda recalibrar el Elecsys 2010 después de 1 mes si se trata del mismo lote de reactivos y después de 7 días al emplear el mismo estuche de reactivos en los analizadores. El Elecsys 1010 con cada estuche de reactivos, al cabo de 7 días a temperatura ambiente de 20-25 °C, y al cabo de 3 días a temperatura ambiente 25-32°C. Para ambos analizadores, en caso necesario, por ejemplo en control de calidad fuera del intervalo indicado.

Verificación de la calibración: no es necesaria pues el software del analizador comprueba automáticamente la validez de la curva e indica eventuales desviaciones.

### **Cálculo**

Los Elecsys 1010 y 2010 calculan automáticamente la concentración de prolactina de cada muestra.

Factores de conversión.

MicroUI/ml x 0.047 = ng/ml

Ng/ml x 21.2 = MicroUI/ml

### **Limitaciones del análisis - interferencias**

El test no se ve afectado por ictericia (bilirrubina <23 mg/dl), hemólisis (Hb <1 g/dl), lipemia (Intralipid < 2000 mg/dl), biotina <100 ng/ml (criterio: recuperación +- 10% del valor inicial).

En pacientes en tratamiento con altas dosis de biotina (>5 mg/día), la extracción de la muestra debería efectuarse no antes de 8 horas tras la última administración de biotina.

No se han observado interferencias por factores reumatoides hasta aprox. 1700 U/ml. ni en muestras de pacientes sometidos a diálisis

Sin efecto High-Dose-Hook con concentraciones de prolactina hasta 200000 microUI/ml. ó resp. 9440 ng/ml.

Se han analizado in vitro 17 fármacos de uso frecuente y no se han observado interferencias.

Este test, al igual que todos los tests que contienen anticuerpos monoclonales de ratón, puede dar resultados falsos con muestras de pacientes en tratamientos con dichos anticuerpos. El test Prolactina Elecsys contiene aditivos que minimizan tales influencias. En casos muy raros pueden producirse interferencias por títulos extremadamente altos de anticuerpos contra la estreptavidina.

Al determinar la prolactina, se debe tener en cuenta que la concentración medida depende del momento de la extracción de sangre, que la liberación de prolactina se efectúa de forma pulsátil y que además está sujeta a un ciclo de 24 horas.

La liberación de prolactina se estimula fisiológicamente durante la lactancia ó en situaciones de estrés. Además, algunos fármacos como las dibenzodiazepina y fenotiacina así como TRH y estrógenos provocan concentraciones elevadas de prolactina en suero .

La liberación de prolactina se inhibe por dopamina, L-Dopa y derivados de ergotamina.

Varias publicaciones hacen referencia a la presencia de macroprolactina en el suero de pacientes con diferentes afecciones endocrinológicas ó durante el embarazo e indican asimismo que se han registrado divergencias entre diferentes inmunoensayos al determinar los niveles de macroprolactina séricos (ultra big > 160kD) frente a la prolactina monomérica (22-23 kD). Esto podría significar que la detección de una hiperprolactinemia depende del inmunoensayo que se utilice .

Para el diagnóstico, los resultados de Prolactina Elecsys siempre deben interpretarse teniendo en cuenta la anamnesis del paciente, el análisis clínico así como los resultados de otros exámenes.

### **Intervalo de medición**

10-10000 microUI/ml ó resp. 0.470-470 ng/ml (definido por el límite de detección y el máximo de la curva master). Valores inferiores al límite de detección se indican como < 10 microUI/ml ó resp. 0.470 ng/ml y los superiores como >10000

microUI/ml ó resp. 470 ng/ml. ó hasta 100000 microUI/ml ó resp. 4700 ng/ml para muestras diluidas diez veces.

### **Dilución de las muestras**

Las muestras conteniendo concentraciones de prolactina superiores al intervalo de medición pueden diluirse con Diluent Universal Elecsys. Se recomienda una dilución de 1:10 (por los analizadores Elecsys 1010/2010 ó manualmente). La concentración de la muestra diluida debe ser > de 50 microUI/ml ó resp. > 2.4 ng/ml. En caso de dilución manual, multiplicar los resultados por el factor de dilución. En caso de dilución automática, el software de los analizadores 1010/2010 xcalcula automáticamente la concentración de la muestra.

### **Intervalo de referencia en varones**

n: 116. Percentiles: **50**: 181 microUI/l; **5**: 86 microUI/l; **95**: 390 microUI/l

Cada laboratorio debería comprobar si los intervalos de referencia pueden aplicarse a su grupo de pacientes, y, en caso necesario, establecer sus propios valores.

### **Características del test.**

#### **Precisión**

La reproductibilidad ha sido determinada mediante reactivos Elecsys, un pool de suero humano y de controles según un protocolo modificado (EP5-T) del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards): 6 veces por día en el plazo de 10 días (n=60) con los resultados siguientes:



	VM		Precisión intraensayo			Precisión total		
			DE		%CV	DE		%CV
	MicroUI/ml	Ng/ml	MicroUI/ml	Ng/ml		MicroUI/ml	Ng/ml	
Suero humano1	72	3.4	2.0	0.09	2.8	2.6	0.12	3.6
Suero humano 2	657	30.9	16.6	0.78	2.5	27.2	1.28	4.1
Suero humano 3	2332	109.6	78.6	3.69	3.4	102.5	4.82	4.4
PreciControl U1	307	14.4	5.6	0.26	1.8	8.5	0.40	2.8
Precicontrol U2	840	39.5	16.6	0.78	2.0	25.3	1.19	3.0

VM: Valor medio DE: Desviación estándar CV: Coeficiente de variación

### Sensibilidad analítica (límite de detección inferior)

10 mUI/ml ó resp. 0.47 ng/ml El límite de detección equivale a la concentración mínima medible de prolactina que puede distinguirse de cero. Se calcula como la concentración situada a dos desviaciones estandar superiores al estándar más bajo. (calibrador master, Std. 1+2 DE, precisión intraensayo, n =21).

### **Especificidad analítica**

Los anticuerpos monoclonales empleados son altamente específicos para la prolactina. No se han observado reacciones cruzadas con FSH, TSH, hCG, HGH, LH y HPL.

### **Comparación de métodos**

Una comparación del método Prolactina Elecsys (y) con el Enzymun-Test Prolactina (x) basada en un colectivo de pacientes clínicos ha dado las siguientes correlaciones:

Número de muestras medidas: 163.

Passing/Bablok (9-11 de PRL) Regresión lineal

$$Y = 7.89 + 1.10x$$

$$y = 5.80 + 1.12x$$

$$R = 0.996$$

$$r = 0.996$$

$$DE(dm68)=27.5$$

$$Sy.x= 120.3$$

Concentraciones de las muestras: entre aprox. 39 y 6600 microUI/ml ó resp. 1.8 y 310 ng/ml mUI/ml.

### **ENSAYO ESTRADIOL E2**

#### **Función**

Test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de estradiol en suero y plasma humanos.

### **Características**

Los estrógenos son responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en la mujer. Junto con los gestágenos, los estrógenos controlan todas las funciones de la reproducción femenina. El estrógeno biológicamente más activo es el 17 beta estradiol, una hormona esteroide con un peso molecular de 272 D. Los estrógenos se forman principalmente en los ovarios (folículo, cuerpo lúteo) pero también , aunque en menor cantidad , en testículos y la corteza suprarrenal. Aprox. El 98% del estradiol está ligado a proteínas transportadoras (SHBG= sexual hormone binding globulin).

La determinación del estradiol está clínicamente indicada para localizar las causas de trastornos de fertilidad dentro del sistema hipotálamo-hipófisis-gónadas, para detectar ginecomastias, tumores ováricos y testiculares productores de estrógeno, así como hiperplasias de la corteza suprarrenal. Otras indicaciones clínicas son la monitorización de tratamientos de fertilidad y la determinación del momento de la ovulación en la fertilización in vitro (FIV).

El test Elecsys Estradiol es un test competitivo que emplea un anticuerpo monoclonal específicamente dirigido contra el 17 beta estradiol. El estradiol endógeno de la muestra liberado mediante DHT (dihidrotestosterona) compete con el derivado de estradiol añadido de manera exógena, marcado con quelato de rutenio para ocupar los puntos de fijación libres del anticuerpo biotilado .

### **Principio del test**

Test competitivo con una duración total de 18 minutos.

- 1ª incubación: tras la incubación de la muestra (35 microlitros) con un anticuerpo biotinilado específico contra estradiol se forma un complejo inmunológico según la concentración de analito en la muestra.
- 2ª incubación: tras la adición de un derivado de estradiol marcado con quelato de rutenio y de micropartículas recubiertas de estreptavidina, se forma un complejo anticuerpo-hapteno que ocupa los puntos de fijación todavía libres del anticuerpo biotinilado. El complejo entero se fija a la fase sólida por la interacción entre biotina y estreptavidina.
- La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.
- Los resultados se obtienen a partir de una curva de calibración realizada en el sistema mediante una calibración a dos puntos y una curva master incluida en el código de barras del reactivo.

### **Reactivos - contenido y concentraciones**

Estradiol, Elecsys estuche de reactivos, 100 tests

M Micropartículas recubiertas de estreptavidina (tapón transparente), 1 frasco, 6,5 ml. Micropartículas recubiertas de estreptavidina: 0.72 mg/ml,

capacidad de fijación: 470 ng de biotina/mg de micropartículas; conservante.

R1 Anticuerpo anti-Estradiol-biotina (tapón gris), 1 frasco, 10 ml.: anticuerpo policlonal anti-estradiol (conejo) biotinilado 0.4 mg/; DHT 30 ng/ml; tampón MES 50 mmol/l, phg 6.0; conservante.

R2 Estradiol-péptido-RU(bpy)<sub>2+3</sub> (tapón negro), 1 frasco, 10 ml:derivado de estradiol marcado con quelato de Rutenio 2.75 ng/ml; DHT 30 ng/ml; tampón MES 50 mmol/l, ph 6.0; conservante.

### **Obtención y preparación de las muestras**

Suero recogido en tubos estándar de muestra ó tubos conteniendo gel de separación.

Plasma con heparina (NH<sub>4</sub>, Li, Na) heparina, K<sub>3</sub>-EDTA, fluoruro sódico/oxalato potásico.

Estabilidad: 14 días a 2-8° C, 6 meses a -20°C. Congelar una sola vez . Muestras conteniendo precipitado deben centrifugarse antes de realizar el test. No emplear muestras inactivadas por calor,ni muestras ó controles inactivados con azida.

### **Estradiol Elecsys Procedimiento**

Material suministrado: Estradiol Elecsys estuche de reactivos para 100 tests contiene:

- M Micropartículas recubiertas de estreptavidina.
- R1 Anticuerpo anti-estradiol-biotina.
- R2 Estradiol-péptido-Ru(bpy)<sub>2+3</sub>.

Adicionalmente (no suministrado)

- Estradiol CalSet Elecsys para 10 calibraciones ó CalSet II Elecsys.
- PreciControl Universal Elecsys. Para 2x3 ml de Precicontrol Universal 1 y 2.
- Elecsys 1010 ó 2010
- ProCell Elecsys, 6x380 ml de tampón de sistema
- CleanCell Elecsys , 6x380 ml de solución detergente para la célula de lectura
- Assay Cup Elecsys 1010, 12x32 tubos de ensayo ó Assay Cup Elecsys 2010, 60x60 tubos de ensayo
- Assay Tip Elecsys 2010, 30x120 puntas de pipeta
- Equipo de laboratorio usual.

### **Calibradores**

El test Estradiol Elecsys ha sido calibrado mediante ID-GC/MS . Cada reactivo de estradiol contiene un código de barras que incluye la información necesaria para la calibración del lote de reactivos. La curva master preestablecida es adaptada al analizador a través de Estradiol CalSet Elecsys.

Intervalo de calibraciones: Efectuar la calibración una vez por lote con reactivos recién colocados en el analizador (como máximo 24 horas). Se recomienda recalibrar el Elecsys 2010 después de 1 mes si se trata del mismo lote de reactivos y después de 7 días al emplear el mismo estuche de reactivos en los analizadores.

El Elecsys 1010 con cada estuche de reactivos, al cabo de 7 días a temperatura

ambiente de 20-25 °C, y al cabo de 3 días a temperatura ambiente 25-32°C. Para ambos analizadores, en caso necesario, por ejemplo en control de calidad fuera del intervalo indicado.

Verificación de la calibración: no es necesaria pues el software del analizador comprueba automáticamente la validez de la curva e indica eventuales desviaciones.

### **Cálculo**

Los Elecsys 1010 y 2010 calculan automáticamente la concentración de estradiol de cada muestra.

Factores de conversión.

$$\text{Pmol/l} \times 0.273 = \text{pg/ml} \qquad \text{pg/ml} \times 3.67 = \text{pmol/l}$$

### **Limitaciones del análisis - interferencias**

El test no se ve afectado por ictericia (bilirrubina <38 mg/dl), hemólisis (Hb <1.8 g/dl), lipemia (Intralipid < 2000 mg/dl), biotina <24 ng/ml (criterio: recuperación +- 10% del valor inicial).

En pacientes en tratamiento con altas dosis de biotina (>5 mg/día), la extracción de la muestra debería efectuarse no antes de 8 horas tras la última administración de biotina.

Se han analizado in vitro 17 fármacos de uso frecuente y no se han observado interferencias.

El riesgo potencial de interferencias por interacciones inmunológicas de sueros con sustancias del test ha sido minimizado por la incorporación de aditivos apropiados. En casos muy raros pueden producirse interferencias por títulos extremadamente altos de anticuerpos contra la estreptavidina.

Para el diagnóstico, los resultados de Estradiol Elecsys siempre deben interpretarse teniendo en cuenta la anamnesis del paciente, el análisis clínico así como los resultados de otros exámenes.

### **Intervalo de medición**

36.70-16882 pmol/l ó resp. 10.00-4600 pg/ml (definido por el límite de detección y el máximo de la curva master). Valores inferiores al límite de detección se indican como < 36.70pmol/l ó resp. < 10.00 pg/ml y los superiores como >16882 pmol/l ó resp. 4600 pg/ml. ó hasta 84410 pmol/l ó resp. 23000 pg/ml para muestras diluidas cinco veces.

### **Dilución de las muestras**

Las muestras conteniendo concentraciones de estradiol superiores al intervalo de medición pueden diluirse 1:5 con suero humano (concentración: aprox. 180-1500 pmol/l ó resp. 50-400 pg/ml) La concentración real de estradiol de la muestra se calcula según la fórmula siguiente:  $C = c+4 (c-D)$

C = Concentración real de estradiol en la muestra

C = Concentración de estradiol medida

D = Concentración de estradiol en el diluyente (suero humano)



**Intervalo de referencia en varones**

n: 266		Percentiles			
		50%	5-95%	50%	5-95%
Varones	N	Pmol/l		Pg/ml	
	266	105	49.6-218	28.7	13.5-59.5

Cada laboratorio debería comprobar si los intervalos de referencia pueden aplicarse a su grupo de pacientes, y, en caso necesario, establecer sus propios valores.

**Características del test.**

**Precisión**

Reproductibilidad determinada mediante reactivos Elecsys. Pool de suero humano y de controles según protocolo modificado (EP5-T) del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards): 6 veces día, de 10 días (n=60). Resultados

	VM		Precisión intraensayo			Precisión total		
			DE		%CV	DE		%CV
	Pmol/l	pg/ml	Pmol/l	pg/ml		Pmol/l	Pg/ml	
Suero humano 1	196	53.3	12.7	3.46	6.5	17.6	4.79	9.0
Suero humano 2	1505	410	40.4	11.0	2.7	75.8	20.7	5.0
Suero humano 3	11087	3021	338	92.0	3.0	613	167	5.5
Precicontrol U1	407	111	9.0	2.45	2.2	21.7	5.91	5.3
Precicontrol U2	2294	39.5	16.6	0.78	2.0	25.3	22.5	3.6

VM: Valor medio DE: Desviación estándar CV: Coeficiente de variación

desviaciones estandar superiores al estándar más bajo. (calibrador master, Std. 1+2 DE, precisión intraensayo, n =21).

### **Sensibilidad funcional**

Elecsys 2010: 55 pmol/l ó resp. 15 pg/ml

Elecsys 1010: 95 pmol/l ó resp. 26 pg/ml

### **Especificidad analítica**

Para el derivado de anticuerpos se han obtenido reacciones cruzadas con diversas hormonas, sobre todo derivados de estradiol, estriol, estrona y equileina.

### **Comparación de métodos**

Una comparación del método Estradiol Elecsys (y) con el Enzymun-Test Estradiol (x) basada en un colectivo de pacientes clínicos ha dado las siguientes correlaciones (pg/ml):

Número de muestras medidas: 74.

Passing/Bablok (9-11 de e2) Regresión lineal

$$Y = 12.25 + 0.96x$$

$$y = 42.9 + 0.90x$$

$$R = 0.98$$

$$r = 0.98$$

$$DE(dm68) = 38.71$$

$$Sy.x = 91.96$$

Concentraciones de las muestras: entre aprox. 22 y 2443 pg/ml ó resp. 81 y 8966 pmol/l.

### ENSAYO TESTOSTERONA

#### **Función**

Test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de testosterona en suero y plasma humanos.

#### **Características**

El andrógeno testosterona (17 beta hidroxandrostenona) tiene un peso molecular de 288 daltons. En el hombre la testosterona es sintetizada casi exclusivamente por las células de Leydig de los testículos. La secreción de testosterona es regulada por la hormona luteinizante (LH) y está sometida a una retroacción negativa vía la pituitaria y el hipotálamo. La testosterona promueve el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en el hombre y sirve para mantener la función de la próstata y las vesículas seminales.

Mucha de la testosterona circulante está unida a proteínas transportadoras (SHBG= sex hormone binding globulin).

En la mujer se forman pequeñas cantidades de testosterona en los ovarios. En concentraciones fisiológicas los andrógenos no tienen efectos específicos en la mujer. El incremento de testosterona en la mujer puede causar virilización (dependiendo del incremento).

En el hombre se determina testosterona cuando se sospecha una reducción en la producción de esta, por ejemplo en hipogonadismo, terapia con estrógenos, aberraciones cromosómicas (como en el síndrome de Klinefelter) y cirrosis hepática.

El test Elecsys Testosterona es un test competitivo que emplea un anticuerpo monoclonal específicamente dirigido contra la testosterona. La testosterona endógena de la muestra liberado por ANS (8-anilino-1-naftaleno ácido sulfónico) y norgestrel compite con el derivado de testosterona añadido de manera exógena, marcado con quelato de rutenio para ocupar los puntos de fijación libres del anticuerpo biotinilado

### **Principio del test**

Test competitivo con una duración total de 18 minutos.

- 1<sup>a</sup> incubación: 50 microlitros de muestra son incubados con un anticuerpo biotinilado específico contra testosterona y un derivado de testosterona marcado con un complejo de rutenium. Los sitios de unión con el anticuerpo marcado se ocupan parcialmente por la muestra a analizar (dependiendo de su concentración) y parcialmente por el hapteno marcado con rutenium para formar los respectivos inmunocomplejos.
- 2<sup>a</sup> incubación: tras la adición de micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo entero se fija a la fase sólida por la interacción entre biotina y estreptavidina.
- La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.

- Los resultados se obtienen a partir de una curva de calibración realizada en el sistema mediante una calibración a dos puntos y una curva master incluida en el código de barras del reactivo.

### **Reactivos - contenido y concentraciones**

Testosterona, Elecsys estuche de reactivos, 100 tests

M Micropartículas recubiertas de estreptavidina (tapón transparente), 1 frasco, 6,5 ml. Micropartículas recubiertas de estreptavidina: 0.72 mg/ml, capacidad de fijación: 470 ng de biotina/mg de micropartículas; conservante.

R1 Anticuerpo anti-testosterona Ab-biotina (tapón gris), 1 frasco, 8 ml.: anticuerpo policlonal anti-testosterona (ratón) biotinilado 55 ng/ml; tampón fosfato 40 mmol/l, ph 7.0; conservante.

R2 Testosterona-péptido-RU(bpy)<sub>2</sub>+3 (tapón negro), 1 frasco, 8 ml: derivado de testosterona marcado con quelato de Rutenio 3 ng/ml; reactivo liberador ANS/norgestrel; tampón fosfato 40 mmol/l, ph 7.0; conservante.

### **Obtención y preparación de las muestras**

Suero recogido en tubos estándar de muestra ó tubos conteniendo gel de separación.

Plasma con heparina (NH<sub>4</sub>, Li, Na) heparina, K<sub>3</sub>-EDTA, fluoruro sódico/oxalato potásico. Si se usa citrato sódico, a los valores obtenidos se debe añadir un 10%.

Estabilidad: 14 días a 2-8° C, 6 meses a -20°C. Congelar una sola vez . Muestras conteniendo precipitado deben centrifugarse antes de realizar el test. No emplear muestras inactivadas por calor, ni muestras ó controles inactivados con azida.

### **Testosterona Elecsys Procedimiento**

Material suministrado: Testosterona Elecsys estuche de reactivos para 100 tests contiene:

- M Micropartículas recubiertas de estreptavidina.
- R1 Anticuerpo anti-testosterona-biotina.
- R2 Testosterona-péptido-Ru(bpy)<sub>2</sub>+3.

Adicionalmente (no suministrado)

- Testosterona CalSet Elecsys para 10 calibraciones.
- PreciControl Universal Elecsys. Para 2x3 ml de Precicontrol Universal 1 y 2.
- Elecsys 1010 ó 2010
- ProCell Elecsys, 6x380 ml de tampón de sistema
- CleanCell Elecsys , 6x380 ml de solución detergente para la célula de lectura
- Assay Cup Elecsys 1010, 12x32 tubos de ensayo ó Assay Cup Elecsys 2010, 60x60 tubos de ensayo
- Assay Tip Elecsys 2010, 30x120 puntas de pipeta
- Equipo de laboratorio usual.

### **Calibradores**

El test Testosterona Elecsys ha sido calibrado mediante ID-GC/MS . Cada reactivo de testosterona contiene un código de barras que incluye la información necesaria para la calibración del lote de reactivos. La curva master preestablecida es adaptada al analizador a través de Testosterona CalSet Elecsys.

Intervalo de calibraciones: Efectuar la calibración una vez por lote con reactivos recién colocados en el analizador (como máximo 24 horas). Se recomienda recalibrar el Elecsys 2010 después de 1 mes si se trata del mismo lote de reactivos y después de 7 días al emplear el mismo estuche de reactivos en los analizadores. El Elecsys 1010 con cada estuche de reactivos, al cabo de 7 días a temperatura ambiente de 20-25 °C, y al cabo de 3 días a temperatura ambiente 25-32°C. Para ambos analizadores, en caso necesario, por ejemplo en control de calidad fuera del intervalo indicado.

Verificación de la calibración: no es necesaria pues el software del analizador comprueba automáticamente la validez de la curva e indica eventuales desviaciones.

### **Cálculo**

Los Elecsys 1010 y 2010 calculan automáticamente la concentración de testosterona de cada muestra.

Factores de conversión: nmol/l            x 0.288 = ng/ml

ng/ml            x 3.47 = nmol/l

### **Limitaciones del análisis - interferencias**

El test no se ve afectado por ictericia (bilirrubina <30 mg/dl), hemólisis (Hb <1.8 g/dl), lipemia (Intralipid < 2000 mg/dl), biotina <30 ng/ml (criterio: recuperación +- 10% del valor inicial).

En pacientes en tratamiento con altas dosis de biotina (>5 mg/día), la extracción de la muestra debería efectuarse no antes de 8 horas tras la última administración de biotina.

Se han analizado in vitro 17 fármacos de uso frecuente y no se han observado interferencias.

El riesgo potencial de interferencias por interacciones inmunológicas de sueros con sustancias del test ha sido minimizado por la incorporación de aditivos apropiados. En casos muy raros pueden producirse interferencias por títulos extremadamente altos de anticuerpos contra la estreptavidina.

Para el diagnóstico, los resultados de Testosterona Elecsys siempre deben interpretarse teniendo en cuenta la anamnesis del paciente, el análisis clínico así como los resultados de otros exámenes.

### **Intervalo de medición**

0.069-52.00 nmol/l ó resp. 0.020-15.00 ng/ml (definido por el límite de detección y el máximo de la curva master). Valores inferiores al límite de detección se indican como < 0.069 nmol/l ó resp. < 0.020 ng/ml y los superiores como >= 52.00 nmol/l ó resp. >= 15.00 ng/ml..



### Dilución de las muestras

Las muestras conteniendo concentraciones de testosterona superiores al intervalo de medición pueden diluirse 1:5 con suero humano. Debido al amplio rango de medida es improbable que sea necesario.

### Intervalo de referencia en varones

		n: 132			
		Percentiles			
		50%	5-95%	50%	5-95%
Varones	N	nmol/l		ng/ml	
	132	17.5	9.9-27.8	5.0	2.8-8.0

Cada laboratorio debería comprobar si los intervalos de referencia pueden aplicarse a su grupo de pacientes, y, en caso necesario, establecer sus propios valores.

Características del test.

### Precisión

Reproductibilidad determinada mediante reactivos Elecsys, un pool de suero humano y de controles según un protocolo modificado (EP5-T) del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards): 6 veces día, 10 días (n=60).

	Precisión intraensayo					Precisión total		
	VM		DE		%CV	DE		%CV
	nmol/l	ng/ml	nmol/l	ng/ml		nmol/l	ng/ml	
Suero humano 1	0.85	0.24	0.038	0.011	4.6	0.062	0.0188	7.4
Suero humano 2	9.55	2.75	0.132	0.038	1.4	0.212	0.061	2.2
Suero humano 3	24.3	7.01	0.267	0.077	1.1	0.409	0.118	1.7
PreciControl U1	21.5	6.20	0.201	0.058	0.9	0.337	0.097	1.6
Precicontrol U2	6.75	1.95	0.115	0.033	1.7	0.174	0.050	2.6

**VM: Valor medio. CV: Coeficiente de variación. DE: Desviación estándar**

**Sensibilidad analítica (límite de detección inferior)**

0.069 nmol/l ó resp. 0.02 ng/ml

El límite de detección equivale a la concentración mínima medible de testosterona que puede distinguirse de cero. Se calcula como la concentración situada a dos desviaciones estandar superiores al estándar más bajo. (calibrador master, Std. 1+2 DE, precisión intraensayo, n =21).

**Sensibilidad funcional**

0.42 nmol/l (0.12 ng/nml)

La sensibilidad funcional es la menor concentración de testosterona cuya medición puede ser reproducida con un CV interensayo de  $\leq 20\%$ .

**Especificidad analítica**

Para el derivado de anticuerpos se han obtenido reacciones cruzadas con diversas hormonas androgénicas.

### **Comparación de métodos**

Una comparación del método Testosterona Elecsys (y) con el RIA testosterona (x) basada en un colectivo de pacientes clínicos ha dado las siguientes correlaciones (ng/ml):

Número de muestras medidas: 71.

Passing/Bablok (8-10 de T)    Regresión lineal

$$Y = -0.11 + 1.02x$$

$$y = 0.05 + 0.96x$$

$$R = 0.96$$

$$r = 0.96$$

$$DE(dm68) = 0.349$$

$$Sy.x = 0.459$$

Concentraciones de las muestras: entre aprox. 0.7 y 44 nmol/l (aprox. 0.2 y 12.7 ng/ml).

### **ENSAYO TIROTROPINA-TSH**

#### **Función**

Test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa de la tirotropina en suero y plasma humanos.

#### **Características**

La hormona tiroestimulante (TSH, Tirotropina) es una glicoproteína con un peso molecular de aprox. 30000 D, compuesta de dos subunidades. La subunidad beta contiene la información inmunobiológica específica de la TSH mientras que

la cadena alfa contiene la información específica de la especie y equivale en su secuencia de aminoácidos a la cadena alfa de LH, FSH y HCG.

La TSH se produce en las células basófilas específicas de la hipófisis anterior y está sujeta a un ritmo circadiano de secreción. La liberación hipofisaria de la TSH constituye el principal mecanismo regulador de la acción biológica de las hormonas tiroideas. El efecto de la TSH sobre las fases de formación y secreción de las hormonas tiroideas es tanto estimulante como proliferante. La determinación de TSH sirve como test inicial en el diagnóstico tiroideo. Pequeñas variaciones en la concentración de la fracción libre de las hormonas tiroideas implican importantes alteraciones del nivel de TSH. Por lo tanto, la TSH es un parámetro altamente y específico para la interpretación de la función tiroidea, idóneo para la detección y/o exclusión de alteraciones en el mecanismo de regulación entre hipotálamo, hipófisis y tiroides .

En el test TSH Elecsys se emplean un anticuerpo monoclonal específico de la TSH humana como anticuerpo de captura y un anticuerpo marcado con quelato de rutenio en forma de anticuerpo quimérico (ratón-hombre) para evitar interferencias producidas por anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA).

El principio del test, los reactivos, contenido y concentraciones del estuche Elecsys del reactivo, las medidas de precaución y advertencias, la preparación de los reactivos, conservación y estabilidad, obtención y preparación de las muestras, el procedimiento, la realización del test, la calibración, el control de calidad, el cálculo y las limitaciones de análisis e interferencias son similares a las de la determinación de otras hormonas que se han descrito previamente.

El **intervalo de medición** es 0.005-100.0 microUI/ml (definido por el límite de detección y el máximo de la curva master). La sensibilidad funcional es de 0.014 microUI/ml (6 de TSH). Los valores inferiores al límite de detección se indican como <0.005 microUI/ml y los superiores como > 100.0 microUI/ml (ó hasta 1000 microUI/ml para muestras diluidas 10 veces).

El **intervalo de referencia** es de 0.27-4.2 microUI/ml. Estos valores han sido determinados a partir de los resultados obtenidos de 516 voluntarios sanos y equivalen a los percentiles 2.5 y 97.5.

La **sensibilidad analítica (límite de detección inferior)** es de 0.005 microUI/ml. Equivale a la más baja concentración de TSH medible que puede distinguirse de cero. Se calcula como la concentración situada a dos desviaciones estándar superiores al estándar más bajo (calibrador master, Std. 1+2 DE, precisión intraensayo, n = 21).

La **sensibilidad funcional** es de 0.014 microUI/ml. Es la más baja concentración de TSH medible con reproducibilidad con un coeficiente de variación interensayo del 20%.

Para los anticuerpos monoclonales empleados se han obtenido las siguientes reacciones cruzadas: LH 0.038%, FSH 0.008%, HGH y HCG sin reactividad cruzada.

### **Comparación de métodos**

Una comparación del método TSH Elecsys (y) con del Enzimun Test TSH (x) basada en un colectivo de pacientes clínicos ha dado las siguientes correlaciones:

Número de muestras medidas: 109.

Passing/Bablok (9-11 de TSH) Regresión lineal

$$Y = 0.01 + 1.01x$$

$$y = 0.04 + 0.98x$$

$$R = 0.99$$

$$r = 0.99$$

$$DE(dm68) = 0.060$$

$$Sy.x = 0.261$$

Concentraciones de las muestras: entre aprox. 0 y 19 microUI/ml.

## ENSAYO INHIBINA B

### **Anticuerpos monoclonales.**

La preparación del anticuerpo monoclonal R1 reactante con la alfa subunidad de la inhibina humana y la preparación y uso de su fragmento F(ab) juntado a la fosfatasa alcalina ha sido descrito previamente para su uso en el ensayo de la inhibina A. Un nuevo anticuerpo monoclonal para la subunidad beta B de la inhibina inmunizando ratones HPG hipogonádicos con un péptido sintético de la proximidad del C-terminal de la subunidad madura beta-B. El péptido sintético IPTKLSTMSMLYFD-DEYNI VKRDVPMIVEECG, fabricado por la química standard Fmoc, fue unido a la tuberculina y usado para inmunizar con BCG los ratones fundamentales, como ya se describió previamente para un péptido similar de la subunidad beta-A. El ratón fue inmunizado tres veces a intervalos mensuales con un conjugado conteniendo 50 microgramos del

péptido en un complemento incompleto de Freund. Finalmente el ratón fue estimulado intravenosamente con la misma cantidad de antígeno en salino. Cuatro días después el bazo fue extirpado y los esplenocitos fueron fundidos con células de mieloma SP2/0 usando polietilen glicol y protocolos standard. Los sobrenadantes de la fusión fueron investigados usando microplacas lavadas con Activina B porcina purificada y procedimientos standard de ELISA, como se ha descrito previamente. El clon C5 que segrega un anticuerpo IgG2a fue seleccionado por su fuerte reacción ELISA. El hibridoma fue cultivado para producir fluido ascítico en ratones desnudos y la IgG fue purificada por métodos standard de cromatografía de proteínas.

### **Standard de Inhibina B.**

Inhibina B recombinante humana fue usada como el standard. El material fue preparado en Genentech (Sur de San Francisco, California) por la coexpresión de los genes alfa y beta-b de la inhibina humana en células del ovario del hamster chino. El medio elaborado fue recolectado y la inhibina B fue purificada usando varios pasos. Estos pasos incluyen cromatografía de cambio de anión en dietilaminoetil-sefarosa, cromatografía de la interacción hidrofóbica en fenil ToyoPearl y fenil-sefarosa CL-4B, y cromatografía de la filtración de gel en Sefacril S-100. Este proceder produce inhibina B altamente purificada (95%) y la concentración de proteína del material purificado fue determinado tanto por análisis de aminoácido ó absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 1,5. La identidad del material final fue confirmada por la secuenciación de N-terminal. La secuenciación de aminoácidos reveló sólo dos secuencias: STPLMSWPWSP-SALR (170 pmol) correspondiente al terminal amino intacto de

la alfa subunidad, y GLEXDGRITNLXXRQQ (215 pmol), correspondiente al esperado amino-terminal subunidad beta-B. El pequeño exceso del último puede ser explicado por cantidades residuales de dímero de activina contaminante vistos en el gel de tinción de plata (se estima que es menos de 5% de proteína, pero con dos secuencias por dímero) o por la presencia de formas truncadas del terminal N de la inhibina dimérica. Sin embargo, si estos estuviesen presentes, no se detectarían por secuenciación y, por lo tanto, no constituirían un contaminante mayor. La ruptura de l N-terminal, la cual ha sido observada previamente durante la purificación y almacenamiento de la inhibina A no afecta la bioactividad de inhibina A, pero podría eliminar el antígeno por el anticuerpo monoclonal R1 en ambos ELISAs de inhibina B e inhibina A.

### **Procedimiento ELISA para Inhibina B.**

El anticuerpo monoclonal C5 fue biotinilado por procedimiento standard y reaccionado con microplacas lavadas con streptavidin disponibles comercialmente (Laboratorios Polymer, Church Stretton, UK). Para cada pocillo de las placas secas de streptavidin se añadieron 50 microlitros 5 microgramos/ml C5 IgG en BSA 1% (peso/volumen). Las placas fueron incubadas entonces toda la noche a temperatura ambiente, recogidas secas y bloqueadas por la adición de 100 microlitros de BSA al 1% (peso/volumen) en 25 mmol/l de buffer Tris-HCL, ph 7.5, conteniendo 0.1% (peso/volumen) de acido de sodio. Las placas cubiertas fueron almacenadas de esta manera en una caja húmeda a 4°C y lavadas inmediatamente antes de usar con la solución de lavado ELISA (0.05% (peso/volumen) de Tween 20 y 0.15 mol/l ClNa en 0.05 mmol/ TrisHCL (pH 7.5)).



Los standards de inhibina B recombinante fueron diluidos en suero humano de postmenopáusicas. Cincuenta microlitros de SDS (Sigma Chemical Co.m, Poole, UK) acuosa al 6% (peso/volumen) fueron añadidos a porciones de 100 microlitros de standards ó muestras de plasma de pacientes en tubos Eppendorf. Los tubos fueron calentados a 100°C durante 3 minutos y enfriados seguido de la adición de 100 microlitros del diluyente del ensayo. El diluyente del ensayo fue Triton X-100 (Sigma) al 5% (peso/volumen), BSA al 10% (peso/volumen) (A3294 Sigma), suero de ratón al 5% (Serotec, Kidlington, UK) y 0.15 mol/l ClNa en 25 mmol/l de buffer Tri-HCl, ph 7.5. A cada tubo se le añadió 50 microlitros de peróxido de hidrógeno al 65 (peso/volumen) (BDH, Poole, UK) y se permitió mantener las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este paso oxida los residuos de metionina en el antígeno para el C5 monoclonal y mejora la inmunorreactividad. Un proceder similar fue descrito previamente para el ensayo de inhibina A.

Una microplaca cubierta por un anticuerpo monoclonal C5, preparado como se describió antes, fue lavado y secado y 100 microlitros de cada muestra tratada fueron añadidos por duplicado a cada placa. La placa fue cubierta e incubada toda la noche en un agitador a temperatura ambiente. Al día siguiente la placa fue lavada y 50 microlitros de conjugado F(ab) R1 fosfatasa alcalina se añadieron en el diluyente ensayo. La concentración óptima de éste fue determinada para cada lote de conjugado. La placa fue agitada a temperatura ambiente durante 1 hora y minuciosamente lavada antes de la adición de 50 microlitros de substrato de fosfatasa alcalina (BRL, Paisley, UK) antes de ser cubierta y agitada 2 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, 50 microlitros de amplificador (BRL) se añadieron a cada pocillo, y se permitió el desarrollo del color durante

10-20 minutos. La reacción entonces fue parada por la adición de 50 microlitros de HCl a 0.4 mol/l en cada pocillo y la placa fue leída a 490 nm en un lector de placas de ELISA automático (Biotek Instruments, Winooski, VT). La curva apropiada y la interpolación de dosis fueron realizadas por el software asociado con el lector.

### **Representación del ensayo.**

El límite de detección del ensayo fue menor de 10 pg/ml. Activina A, activina B, folistatina y pro alfa-C tenían menos de 0.1% de reacción cruzada, mientras que la inhibina A recombinante tenía 0.5% de reacción cruzada en el ELISA de inhibina B. Coeficientes de variación intra- e interplaca fueron inferiores al 10%. Recuperación de picos de inhibina B en las muestras de plasma femenino fue cuantitativo (media, 115%; n:5). Las diluciones seriadas de las muestras de pacientes dieron dosis respuestas paralelas a las del standard recombinante.

### **EQUIPO DE ENSAYO DE INHIBIN -B UTILIZADO.**

PRODUCT CODE : MCA1312KZZ. De OXFORD BIO-INNOVATION LTD. Cherwell Innovation Centre. 77 Heyford Park. Upper Heyford. Oxfordshire OX6 3HD.

**Sólo para uso de investigación, no para propósitos terapéuticos ó diagnósticos.**

### **INDICE DE CONTENIDOS**

1. UTILIZACION DESEADA.
2. INTRODUCCION GENERAL.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO.
4. REACTIVOS PROPORCIONADAOS.
5. ELEMENTOS NO SUMINISTRADOS.
6. RECOGIDA DE MUESTRAS DE PACIENTES.
7. INFORMACION SANITARIA Y DE SEGURIDAD.
8. PREPARACION DE LOS REACTIVOS.
9. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.
10. CARACTERISTICAS DE LA REALIZACION DEL ENSAYO.
11. DATOS TIPICOS.
12. SOPORTE TECNICO.
13. ALMACENAMIENTO.
14. CADUCIDAD.
15. REFERENCIAS.

### UTILIZACION DESEADA.

Este equipo para inmunoensayo permite la medición específica de los niveles de Inhibina B dimérica en plasma y suero humanos. Este ensayo es suficientemente sensible para medir niveles durante todo el ciclo menstrual normal. Además la inhibina B circulante en hombres fértiles normales puede ser determinada usando

este equipo. Las muestras de mujeres tratadas con gonadotropinas ó el fluido folicular ovárico pueden requerir dilución.

MCA1312KZZ contiene todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo (192 pocillos) excepto el peróxido de hidrógeno.

### INTRODUCCION GENERAL.

La inhibina es una hormona polipeptídica segregada por las células de la granulosa del ovario en la mujer y por las células de Sertoli del testículo en el hombre. Suprime selectivamente la secrección de la hormona pituitaria Folículo Estimulante (FSH) y también tiene una acción local paracrina en las gónadas. La forma completamente procesada de la molécula tiene un peso molecular de aproximadamente 32kD y consiste de dos cadenas de distintas (alfa y beta), unidas por puentes disulfuro. Formas de peso molecular mayor con formas precursoras de la subunidad alfa también existen en el fluido folicular y en el suero. Además formas libres de la subunidad alfa, no asociadas a una subunidad beta y sin bioactividad de inhibina, también están presentes.

Inhibina B está compuesta de una subunidad alfa y una subunidad beta-B. Es la inhibina fundamental circulante en el varón y también es producida en la mujer. Su medida sería útil para investigar el papel de la inhibina B en la fisiología reproductiva de hombres y mujeres.

A diferencia de otros equipos del mercado, el equipo de ensayo de inhibina B dimérica de Oxford Bio-Innovation's no detecta las formas libres de la subunidad alfa de la inhibina que se encuentran en el suero humano.

Durante el ciclo menstrual las concentraciones de inhibina B se elevan y descienden en diferentes momentos que la inhibina A sugiriendo diferentes funciones.

Estos ensayos han probado su utilidad en numerosos proyectos de investigación de la Inhibina.

La inhibina A consiste de una subunidad alfa y una subunidad beta-A. Durante el embarazo el sitio fundamental de producción de Inhibina A es la placenta. El papel de esta molécula en el embarazo no es bien conocido pero hallazgos recientes que niveles elevados de inhibina A son un marcador maternal de síndrome de Down's fetal sugieren una posible aplicación práctica del ensayo si se usa en combinación de otros marcadores. También el ensayo parece ser de utilidad para investigar el papel de la inhibina A en la fisiología reproductiva y en la monitorización de pacientes con tumores de las células de la granulosa del ovario. Hasta el reciente desarrollo del ensayo de Inhibina A de Oxford Bio-Innovation's, no era posible distinguir entre inhibina dimérica circulante funcional y subunidad alfa libre en el ciclo menstrual humano normal, como el ampliamnete usado Monash RIA que no podía hacer esta distinción.

L Activina es un factor de crecimiento producido por varios tejidos. En tejidos y fluidos corporales es a menudo encontrado formando complejos con la proteína follistatina. Activina A es un homodímero compuesto por dos subunidades beta-A.

La función de las formas de subunidades alfa libres, por ejemplo pro-alfaC no es conocida, pero las concentraciones circulantes de tales formas exceden en mucho las de la inhibina dimérica.

Oxford Bio-Innovation tiene disponible equipos de inmunoensayo diseñados para el estudio de Inhibina A (ultrasensible; PRODUCT CODE MCA950KZZ), Inhibina A (sensibilidad media; PRODUCT CODE MCA1273KZZ), Inhibina B (PRODUCT CODE MCA1312KZZ), Inhibin Pro-alfa C (PRODUCT CODE MCA1254KZZ) y Activin A (PRODUCT CODE MCA1q426KZZ) para uso investigacional únicamente.

### PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El equipo de inmunoensayo de inhibina B Oxford Bio-Innovation Inhibina B es un ELISA tipo sandwich fase sólida (**Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**).

Son proporcionadas dos placas de microtitulación las cuales estan recubiertas con un anticuerpo monoclonal de la subunidad beta-B de la Inhibina. Las muestras (Incluyendo standards, controles apropiados, etc.) son incubadas en los pocillos de manera que el antígeno se une al anticuerpo capturado ó inmovilizado por su subunidad beta-B. Siguiendo un segundo proceso de lavado se añade una detección de anticuerpos. Este es un anticuerpo monoclonal específico para la subunidad alfa de la inhibina unida a fosfatasa alcalina. Cualquier material que no ha reaccionado es entonces eliminado por lavado antes de la detección de fosfatasa alcalina usando un sustrato sensible amplificado incluido en el equipo. Esto resulta en un producto con reacción roja con una intensidad de color que es directamente proporcional a la concentración de inhibina B dimérica presente en la muestra original.

Antes del ELISA las muestras de los pacientes y los standares son tratados con detergente (SDS), calentados a 100°C, y expuestos a peroxido de hidrógeno. Estos

## MATERIAL Y METODOS

---

tratamientos aumentan la especificidad y sensibilidad del ELISA, e incluso permiten el análisis de muestras hemolizadas.

### REACTIVOS PROPORCIONADOS.

<b><u>Reactivo</u></b>	<b><u>Cantidad</u></b>
Placa Inhibina B	2
Solución 060 al 6% de Sodium Dodecyl-Sulfato (SDS)	1 X 6 ml.
Standard Inhibina B (2000pg/ml)	1
Suero de feto de ternero	2 X 5 ml.
Diluyente 010 del ensayo	1 X 40ml.
Anticuerpos de detección de Inhibina B	2 X 0.1ml.
Lavado buffer concentración 25X	1X100ml.
Substrato	1
Substrato diluyente	1x13ml.
Amplificador	1
Amplificador diluyente	1X13ml.
Solución final	1X13ml.

### ELEMENTOS NO SUMINISTRADOS.

Lector de placa de microtitulación capaz de leer 490 nm, preferentemente con un filtro adicional de referencia.

Lavador de la placa de microtitulación.

Equipo multicanal de pipeteo para dispensar volúmenes de 200 microlitros eficazmente.

Peróxido de hidrógeno fresco.

### RECOGIDA DE MUESTRAS DE PACIENTES.

En este ensayo pueden ser utilizadas muestras de suero humano ó plasma heparinizado.

Cuando sea posible las muestras debes de ser usadas en fresco ó inmediatamente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y almacenadas hasta el ensayo. Diversos ciclos de congelamiento y descongelamiento no alteran significativamente los resultados del ensayo pero no es recomendado.

### INFORMACION SANITARIA Y DE SEGURIDAD <sup>121</sup>.

*Sólo para investigación in vitro.*

#### **Reactivo**

Placa Inhibina B

Solución 060 al 6% de

Sodium Dodecyl-Sulfato (SDS)

Standard Inhibina B (2000pg/ml)



Suero de feto de ternero

Diluyente 010 del ensayo

Anticuerpos de detección de Inhibina B

Lavado buffer concentración 25X

Substrato

Substrato diluyente

Amplificador

Amplificador diluyente

Solución final

Nota 1.

Este producto contiene productos de origen animal y sería por lo tanto manipulado como un potencial peligro biológico. Mantener el mínimo contacto con las manos.

*Nota 2.*

Este producto contiene componentes de origen humano y animal y por lo tanto es en si mismo un peligro biológico. Aunque se han hecho todos los esfuerzos para asegurar que el material es negativo para el antígeno de superficie de hepatitis B y el anticuerpo HIV, no se pueden dar garantías que el material no sea infeccioso. Se deberán tomar los cuidados apropiados y será manipulado sólo por personal cualificado entrenado.

*Nota 3.*

Contiene productos químicos designados no regulados por el Sistema BDH de Clases de Peligros que corresponde a la Clasificación de Peligros de UN.

*Nota 4.*

Este producto contiene sustancias peligrosas. Tomar medidas apropiadas para evitar contacto con la piel e inhalación pues puede resultar en irritación de los ojos, del tracto respiratorio y de la piel. En caso de contacto con la piel lavar con una copiosa cantidad de agua. En caso de ingestión lavar minuciosamente la boca y beber abundante cantidad de agua. Buscar consejo médico.

*Nota 5.*

Este producto contiene sodio ácido, una venenosa y peligrosa sustancia. Es tóxica por inhalación ó ingestión, irritante si entra en contacto con los ojos ó la piel. En el caso de contacto con la piel ó los ojos lavar con abundante cantidad de agua y buscar atención médica.

*Nota 6.*

Este producto contiene 0.46 mol/L ácido sulfúrico. En caso de contacto con la piel lavar con abundante cantidad de agua y buscar atención médica.

### PREPARACION REACTIVOS.

*Reconstitución de suero de feto de ternero.-*

Reconstituir cada vial de suero de feto de ternero añadiendo 5 ml. de agua destilada y mezclar suavemente durante 10 minutos. Dado que este producto no

contiene conservantes se almacenará congelado inmediatamente después de usar. El producto, una vez reconstituido, puede ser congelado y descongelado hasta 6 ciclos.

**NOTA:** El suero de feto de ternero está incluido como un seguro, y más conveniente, matriz alternativa al suero de mujer postmenopáusica.

### *Reconstitución del Standard de Inhibina B.*

Reconstituir el contenido del vial con 1.3 mls. De suero de feto de ternero para conseguir una concentración de Inhibina B dimérica de 2000 pg/ml. El vial se dejará parado, con agitación periódica, durante 30 minutos a temperatura ambiente, para asegurar que el material es completamente disuelto antes de usarle.

**NOTA:** El standard fue preparado extrayendo una mezcla de formas de inhibina del fluido folicular humano. La concentración fue determinada por calibración frente a la inhibina B recombinante de 32kD. El standard no está establecido oficialmente como un standard. El Instituto Nacional para Standards Biológicos (NIBSC) ha producido entretanto un standard internacional inmunopurificado para inhibina B (para uso sólo en ELISA). Mayor información puede ser obtenida de NIBSC, Blanche Lane, South Mimms, y Potters Bar, HERTS EN6 3QG. Fax: 01707 646730.

### *Dilución del Buffer de lavado.*

El Buffer de lavado es suministrado a una concentración de 25X. La concentración sería calentada a temperatura ambiente y mezclada hasta que las sales que precipiten se disuelvan. Para su uso diluir un volumen de concentrado de

buffer de lavado con 24 volúmenes de agua destilada. La solución resultante puede ser almacenada a 4°C durante 5 días.

Preparación de estándares del ensayo.

Preparar una serie de diluciones seriadas de la preparación de referencia como sigue:

1. Añadir 0.3 ml. de suero de feto de ternero a cada uno de los 7 tubos microfugos (1.5 ml).
2. Transferir 0.3 ml de la solución de 2000 pg/ml en el primer tubo, mezclarlo y transferir 0.3 ml al siguiente tubo. Continuar hasta que se realice la última dilución. Las concentraciones standard para usar en el ensayo serán entonces 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.6 pg/ml.
3. Almacenar la dilución standard no utilizada congelada, en alicuotas, a -70°C. Evitar repetir el congelamiento y descongelamiento.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

**Permitir a todos los reactivos llegar a temperatura ambiente (rango 18 a 26°C) antes de usarles. Todos los pasos e incubaciones en este ensayo se realizarán dentro de este rango de temperatura.**

SIEMPRE TRAZAR UNA CURVA STANDARD CON CADA ENSAYO REALIZADO.

1. En tubos microfugos de 1,5 ml separados y etiquetados colocar 100 microlitros de cada dilución standard ó muestra de paciente (muestras de fluido

folicular requerirán una dilución sustancial, al menos 1/500, en el suero de feto de ternero previo al ensayo). En 2 adicionales tubos colocar 100 microlitros de suero de feto de ternero como el cero de las muestras analizadas.

2. Para cada tubo (standard y muestras) añadir 50 microlitros de SDS 060 al 6% (Nota: Permitir a la solución de SDS calentarse a temperatura ambiente antes de usar). Mezclar.
3. Tapar los tubos y colocarlos en agua a 100°C durante 3 minutos.
4. Permitir enfriarse y añadir entonces 100 microlitros del diluyente 010 del ensayo a cada tubo y mezcla.
5. Añadir a cada tubo 50 microlitros de solución de Peróxido de Hidrógeno acuosa al 6% preparada recientemente y mezclarla brevemente. (NOTA: El Peróxido de Hidrógeno es normalmente suministrado como solución al 30%).
6. Mantener los tubos parados a temperatura ambiente durante 30 minutos. Este pretratamiento de las muestras modifica, por oxidación, los residuos de metionina en el antígeno para el anticuerpo capturado, mejorando por lo tanto la afinidad de la reacción.
7. En algunos casos el proceder descrito produce un precipitado ligeramente gelatinoso, el cual puede bloquear el extremo de la pipeta. Se tendrá cuidado al pipetear de asegurarse que el extremo se rellena adecuadamente.
8. Añadir 80 microlitros de cada muestra tratada y standard por duplicado, a los pocillos de la placa. Habrá 4 pocillos conteniendo el analito standard cero.
9. Cubrir y cerrar la placa e incubar toda la noche a temperatura ambiente.

10. A un vial de Anticuerpo de Detección de Inhibina B añadir 1 ml de diluyente del ensayo 010. Recolocar el tapón y mezclar. Remover el contenido y añadir otros nuevos 5 mls. de diluyente 010 del ensayo.
11. Lavar los pocillos de la placa de microtitulación rellenandolos por completo de buffer de lavado diluido y entonces decantar ó aspirar minuciosamente. Repetir este proceder nuevamente 3 veces. Invertir la placa para que drene en papel absorbente.
12. Añadir 50 microlitros del anticuerpo de detección preparado en el punto 10.
13. Cubrir y sellar la placa e incubar a temperatura ambiente durante 3 horas.
14. Lavar como en el punto 11. Pero 8 ciclos finalizando con los pocillos rellenos con buffer. Dejar la placa en remojo durante 15 minutos a temperatura ambiente mientras se prepara el substrato.
15. Preparar el substrato añadiendo el Substrato Diluyente al Substrato Liofilizado. Mezclar durante 5 minutos. **ALMACENAR SUBSTRATO NO USADO A -20°C**
16. Remover el buffer de lavado de los pocillos de la placa y nuevamente lavar la placa 2-3 ciclos. Invertir la placa para que drene en papel absorbente.
17. En cada pocillo de la placa añadir 50 microlitros de la solución de substrato preparada en el punto 15.
18. Cubrir y sellar la placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

19. Preparar el Amplificador añadiendo el Diluyente Amplificador a el Amplificador Liofilizado. Mezclarlo durante 5 minutos.

### **ALMACENAR SUBSTRATO NO USADO A -20°C**

20. A cada pocillo de la placa añadir 50 microlitros de solución amplificador. Agitar suavemente para mezclar.
21. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente. El color aparecerá bastante rápidamente. Leer los valores de absorbancia de cada pocillo a 490 nm, preferiblemente referenciándolos a 620 nm.
22. Detener la reacción añadiendo 50 microlitros de solución final a cada pocillo cuando el standard 1000 pg/ml ha conseguido una absorbancia de 2.0 (15 minutos a 1 hora dependiendo de la temperatura ambiente).

### **Notas:**

- i) El substrato es capaz de un desarrollo de color más allá de 2.5 Ods de longitud de onda de referencia sustraída. La extensión del tiempo de desarrollo asegura que el standard máximo no pasa del rango del lector de la placa.
  - ii) La absorbancia se podrá incrementar alrededor del 10-15% cuando la solución final es añadida.
23. Trazar la curva standard usando un software de 4 parámetros logísticos (4PL) y leer las muestras desde la curva. Si no se dispone de 4PL usar tanto una regresión lineal ó si es más apropiado una curva suave.

### **CARACTERISTICAS DE LA REALIZACION DEL ENSAYO**

1. Sensibilidad: menor de 15 pg/ml.
2. Concentraciones de Inhibina B en suero/plasma humano esperadas

Estudios de investigación están aún procediendo a determinar los rangos normales. La inhibina B es detectable en el suero/plasma de mujeres normales en el ciclo menstrual, particularmente previo a la ovulación, y en hombres fértiles.

- |      |                                                    |                     |
|------|----------------------------------------------------|---------------------|
| i.   | Mujer postmenopáusica normal                       | menor de 5 pg/ml    |
| ii.  | Mujer con hiperovulación                           | menor de 3000 pg/ml |
| iii. | Ciclo menstrual normal<br>(máximo en la ovulación) | 5-200 pg/ml         |
| iv.  | Hombre normal                                      | menor de 400 pg/ml  |
| v.   | Fluido folicular                                   | menor de 1000 ng/ml |

### 3. Especificidad

Este equipo de ensayo detecta inhibina B dimérica y demuestra una mínima reactividad cruzada con la subunidad pro-alfa C ó activinas. Hay una pequeña (aprox.1%) de reacción cruzada con Inhibina A. Muestras que contengan grandes cantidades de Inhibina A relacionada con la Inhibina B son raramente encontradas.

### 4. Recuperación



Se logra alta recuperación del suero y respuestas paralelas al standard cuando se usa MCA 1312KZZ.

#### 4. Reproductibilidad

Los coeficientes de variación interplaca e intraplaca son menores del 7%.

#### 11. DATOS TIPICOS

Los siguientes datos fueron obtenidos con el equipo de ensayo de Inhibina B MCA1312KZZ. La placa fue mantenida a 22°C y el progreso del color fue detenido a los 42 minutos. La placa fue leída a 492 nm y referenciada a 620 nm.

Inhibina B standard (pg/ml)	Absorbancia
0	0.065, 0.063
15,6	0.098, 0.098
31,25	0.131, 0.129
62,5	0.193, 0.196
125	0.324, 0.317
250	0.559, 0.572
500	1.069, 1.093
1000	2.224, 2.240

#### 12. SOPORTE TÉCNICO

Asistencia ó consejo pueden ser obtenidos en nuestro Departamento de Servicio Técnico. Tel.: +44 (0) 1869 238 077 Fax: +44 (0) 1869 238 078

### ALMACENAMIENTO

Previo al uso, los componentes del equipo deben ser almacenados a 2-8°C.

Después:

#### Descripción

#### Almacenamiento

Placa Inhibina B	+2-8°C. NO CONGELAR
Solución 6% Sulfato de sodio Dodecyl (SDS)	+2-25°C. (Calentar a temperatura ambiente antes de usar)
Inhibina B standard de la (Reconstituida)	-20°C en alícuotas después reconstitución
Suero de feto de ternero reconstitución	-20°C después de la reconstitución
Diluyente ensayo	+2-8°C
Anticuerpo de detección de Inhibina B	+2-8°C. NO CONGELAR
Buffer lavado-concentración 25X	+2-8°C
Substrato reconstitución Diluyente substrato de la reconstitución Amplificador después de la reconstitución	-20°C después de la reconstitución -20°C después -20°C

Diluyente amplificador	-20°C después de la reconstitución
Solución final	+2-8°C

### CADUCIDAD

Almacenado correctamente este producto tiene una caducidad detallada en la etiqueta del exterior del equipo.

### Análisis Estadístico

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumen en su media, error estándar (EE), rango e intervalo de confianza al 95. En todos los casos se comprobará la distribución de la variable frente a los modelos teóricos. Se calculan los percentiles del 10 al 90 de los parámetros estudiados.

Se evaluará la asociación entre variables cualitativas con el test de  $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher, en el caso de que más de un 25% de los esperados fueran menores de 5. En el caso de variables ordinales se contrastará la hipótesis de tendencia ordinal de proporciones. Se estimará la odds ratio junto a su intervalo de confianza al 95% según el método de Cornfield.

Se analiza el comportamiento de las variables cuantitativas por cada una de las variables independientes categorizadas mediante el test de la t de Student (en comparaciones de una variable con dos categorías) y/o el análisis de la variancia (ANOVA). Mediante esta técnica se evalúa las diferencias de medias debido al efecto individual (por grupos de estudio), o principal de cada factor y/o al efecto de sus interacciones.

Para el análisis entre pares de variables cuantitativas (FSH e inhibina B) se utilizará el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ). Se determinará el contraste de la hipótesis nula de que el coeficiente es igual a 0. Cuando la relación sea lineal, se ajustará un modelo de regresión múltiple, considerando las variables confusoras (edad...) La estimación de parámetros se calculará mediante el método de mínimos cuadrados.

Para extraer el punto discriminativo se analizó con una Curva de Rendimiento Diagnóstico (COR) el nivel de inhibina B en los grupos estudiados. Se obtuvieron los índices de validez de criterio.

En todos los casos se comprobará la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y se contrastará la hipótesis de homogeneidad de variancias.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazará la hipótesis nula con un error de tipo I o error  $\alpha$  menor a 0.05.

El paquete informático utilizado para el análisis fue SPSS para Windows versión 10.0.

# **RESULTADOS**

### Características de la población

La edad de los 70 pacientes participantes en el estudio varió desde 48 hasta 88 años, media de 72.71 años, desviación típica 9.35. La diferencia de la edad entre los pacientes de ambos grupos varió en un rango de 0-11 años, media de diferencia de edad de 4 años, desviación estándar 2.58 y mediana 4 años, constituyendo 35 parejas. El objeto del apareamiento es eliminar el posible sesgo de la edad en los resultados de las determinaciones hormonales. Las características de la edad de ambos grupos se muestran en la **Tabla III**.

	Grupo II	Grupo I
Máximo	84	88
Mínimo	50	48
Media	74,5	70,9
DE	8,05	9,98
Mediana	76	73

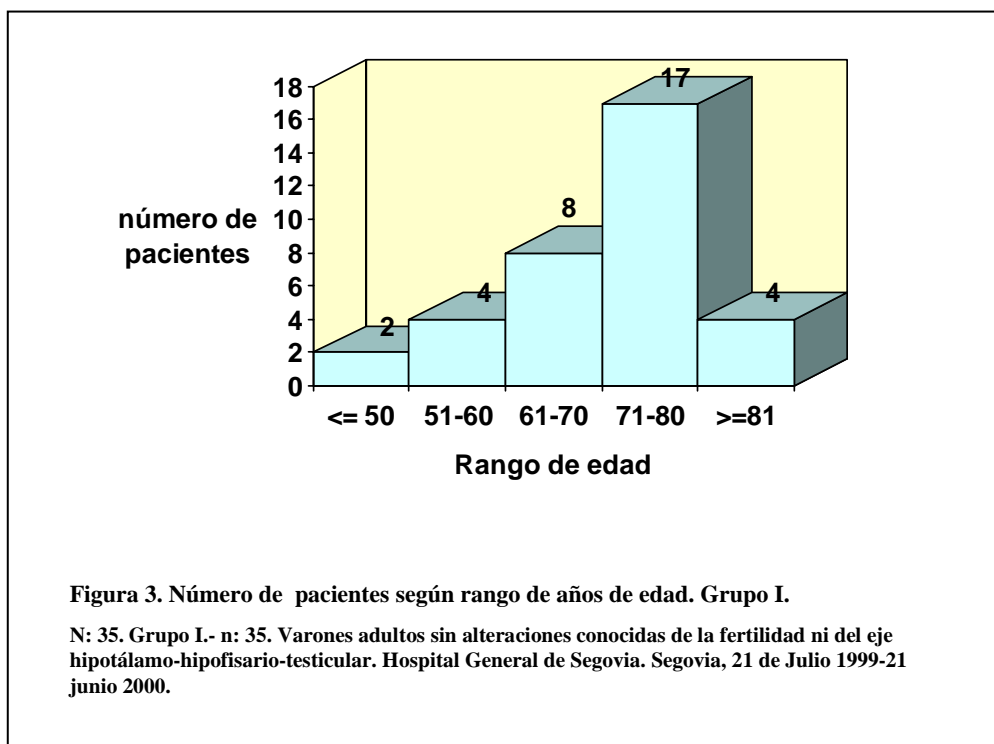
Tabla III. Años de edad de los pacientes.

N: 70. Grupo I.- n: 35. Varones adultos sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Grupo II.- n: 35. Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, antes de dicho tratamiento. DE: Desviación estándar. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

Características de la población del Grupo I

La edad de los 35 pacientes de este grupo osciló entre 48 y 88 años, media 70,9 años; desviación estándar 9,98; mediana 73 años. El mayor número de pacientes se encontraba en el rango de edad de 71-80 años. **Figura 3**

Hubo 34 pacientes con descendencia y 1 paciente sin hijos, por causa femenina no precisada. El número de hijos varió entre 0 y 6; media 2,6; desviación estándar 1,17; mediana de 2.

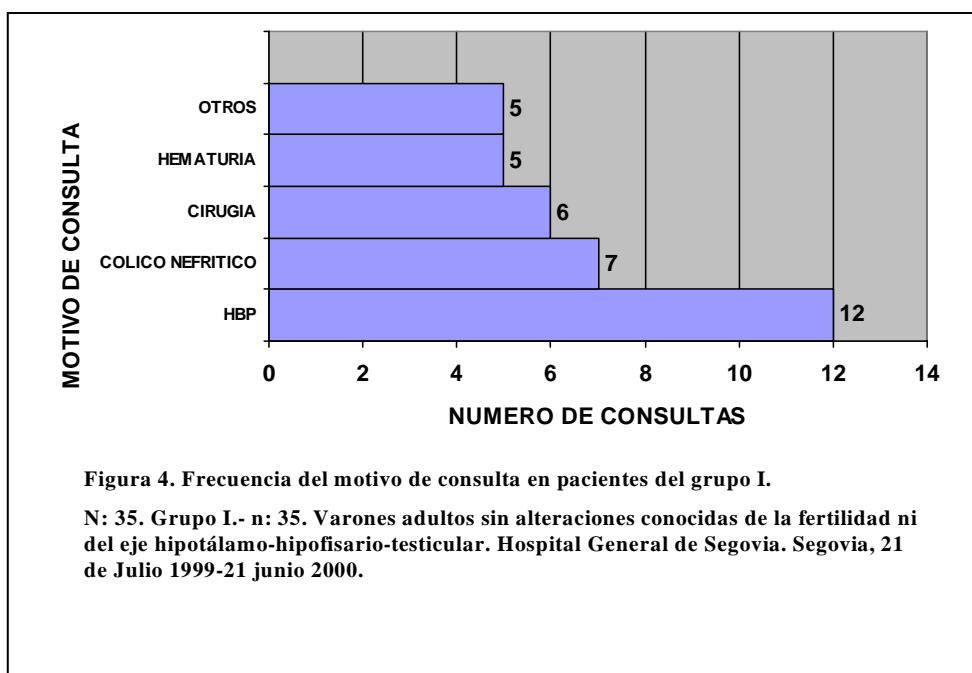


Ningún paciente presentaba antecedentes de alteraciones de la fertilidad.

En el grupo I un paciente tenía antecedentes de anorquia unilateral. El testículo único de este paciente tenía un volumen de 41,9 ml y era de consistencia normal.

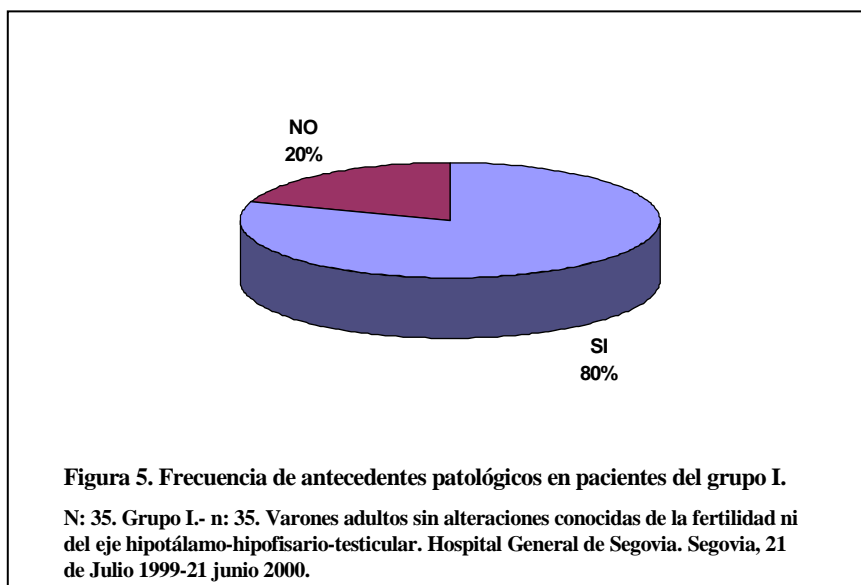
El nivel de FSH era de 11,92 mUI/ml; de LH 8,34 mUI/ml; de testosterona total

2,43 ng/ml; prolactina 10,77 ng/ml; de TSH 2,9 microUI/ml; de estradiol 26,21 pg/ml ; de inhibina B 15,6 pg/ml y la razón inhibina B/FSH fue 1,3 pg/mUI. Otro paciente sufría epididimitis crónica. El motivo más frecuente de consulta en este grupo ha sido revisión en consultas por hiperplasia benigna de próstata (HBP) en 12 pacientes, 34%, seguido de ingreso por cólico nefrítico en 7, ingreso para cirugía en 6. Estas cirugías fueron RTU próstata en 2 de ellos, RTU vejiga en otros 2, prostatectomía suprapúbica en 1 y cervicotomía en otro. Estudio de hematuria en consultas ó planta de hospitalización fue el motivo en 5. Otras causas de motivo de consulta incluyeron cáncer de próstata, infección urinaria, litiasis vesical y epididimitis crónica. **Figura 4.**



En 28 pacientes, 80%, de los pacientes del grupo I tenían algún antecedente de enfermedad **Figura 5.** En 14 de los pacientes de este grupo, alguna de las enfermedades, exceptuando la diabetes y la obesidad, podía tener un





potencial efecto tóxico en la espermatogénesis ó en los niveles de testosterona ó gonadotropinas.

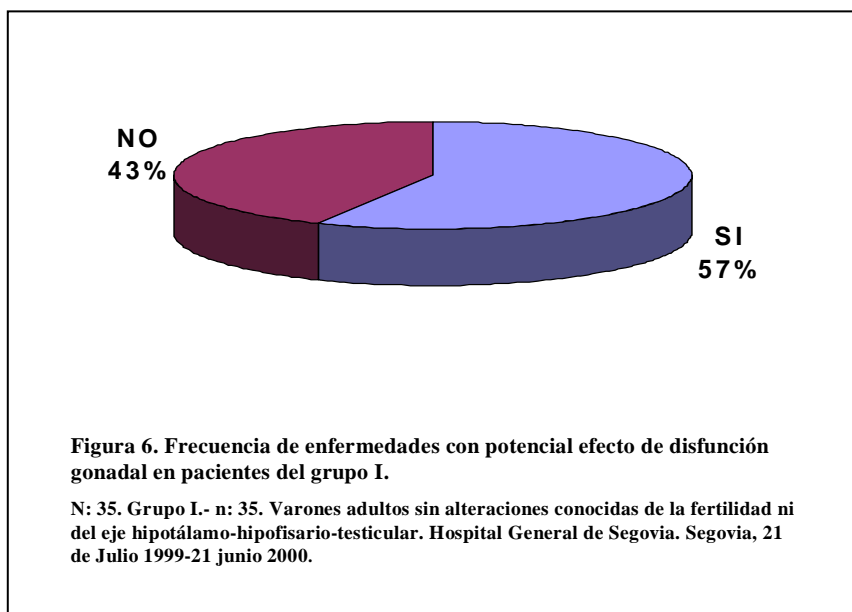
Diabetes mellitus la padecían 7 enfermos, asociada a obesidad en 2 de ellos. No se detectó ningún otro antecedente endocrino en 28 pacientes.

Hubo 20 pacientes, el 57% de los de este grupo, que padecían alguna enfermedad, incluidas diabetes y obesidad, con potencial afectación del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. **Figura 6.**

Hubo 28 pacientes, el 80%, que tomaban medicación por diversos motivos, con un número de fármacos administrado entre 1 y 5, promedio 2.1, desviación estándar 1.18, mediana 2 .

En 12 pacientes, el 34% de este grupo, se detectó ingesta de fármacos con potencial efecto de disfunción gonadal, predominando los hipotensores y psicotropos.

En ningún paciente la exploración física general realizada hizo sospechar hipogonadismo precoz ó tardío, ú otras endocrinopatías.



### Características de la población del grupo II

La edad de los 35 pacientes de este grupo osciló entre 50 y 84 años, media 74,5 años, desviación estándar 8,05, mediana 76. El mayor número de pacientes se situó en el rango 71-80 años, en 18 de ellos. **Figura 7.**

Hubo 32 pacientes con descendencia y 3 pacientes sin ella. En estos últimos pacientes, en 1 caso fue por no tener pareja y en los otros 2 por causa no determinada. El número de hijos varió entre 0 y 7; media 3; desviación estándar 1,64; mediana de 3.

No se detectaron antecedentes de alteraciones de la fertilidad por causa masculina conocida en este grupo.

Ningún paciente del grupo II sufría enfermedad gonadal en el momento del estudio según la definición de las variables.

En el grupo II la causa más frecuente de consulta ha sido la revisión del cáncer de próstata en tratamiento de bloqueo androgénico, en el 80% de los casos, 28 pacientes.

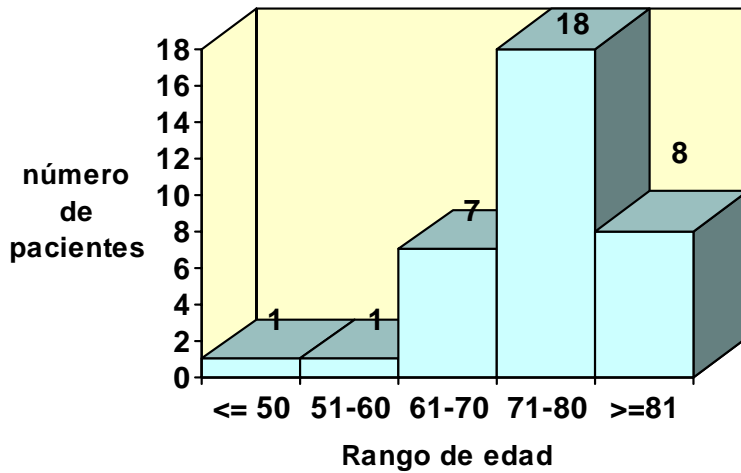


Figura 7. Número de pacientes según rango de años de edad. Grupo II.

N: 35. Grupo II.- n: 35. Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, antes de dicho tratamiento. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

En 5 pacientes se requirió atención urológica para intervención quirúrgica, de prostatectomía radical en 3 casos, resección transuretral de próstata y uretrotomía endoscópica por estenosis uretral en los otros dos. Ingreso por hematuria e hidronefrosis, respectivamente, fue el motivo de acudir en los restantes. **Figura 8.**

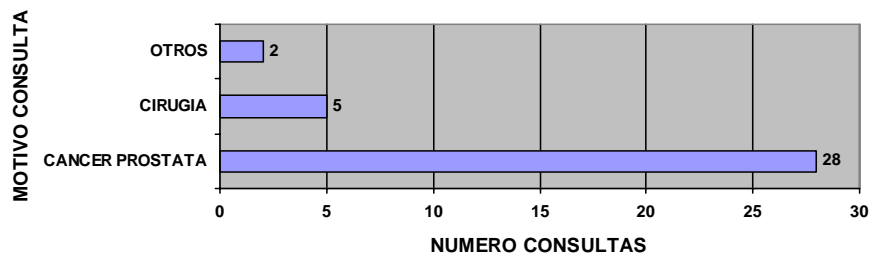
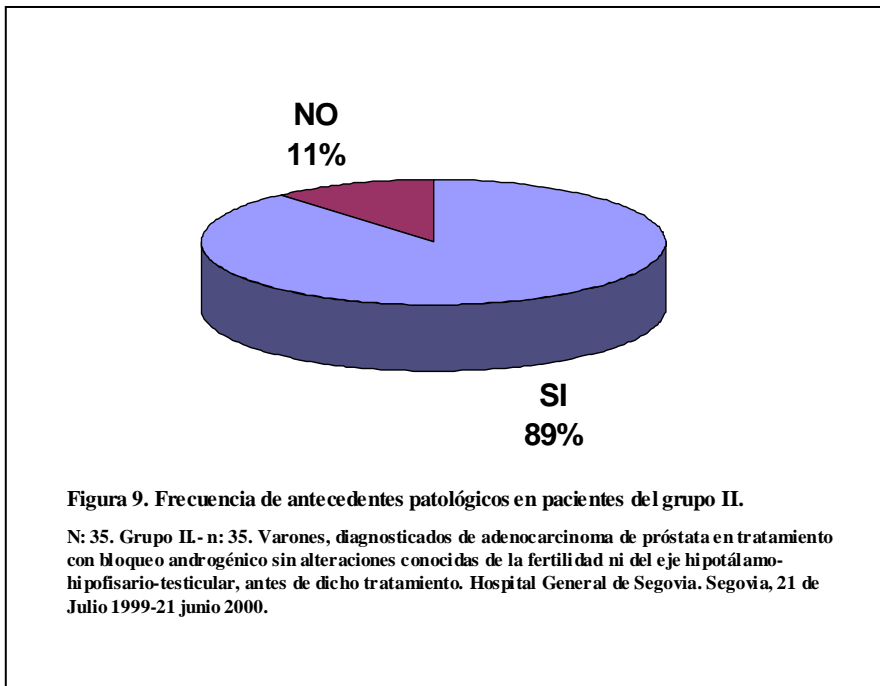


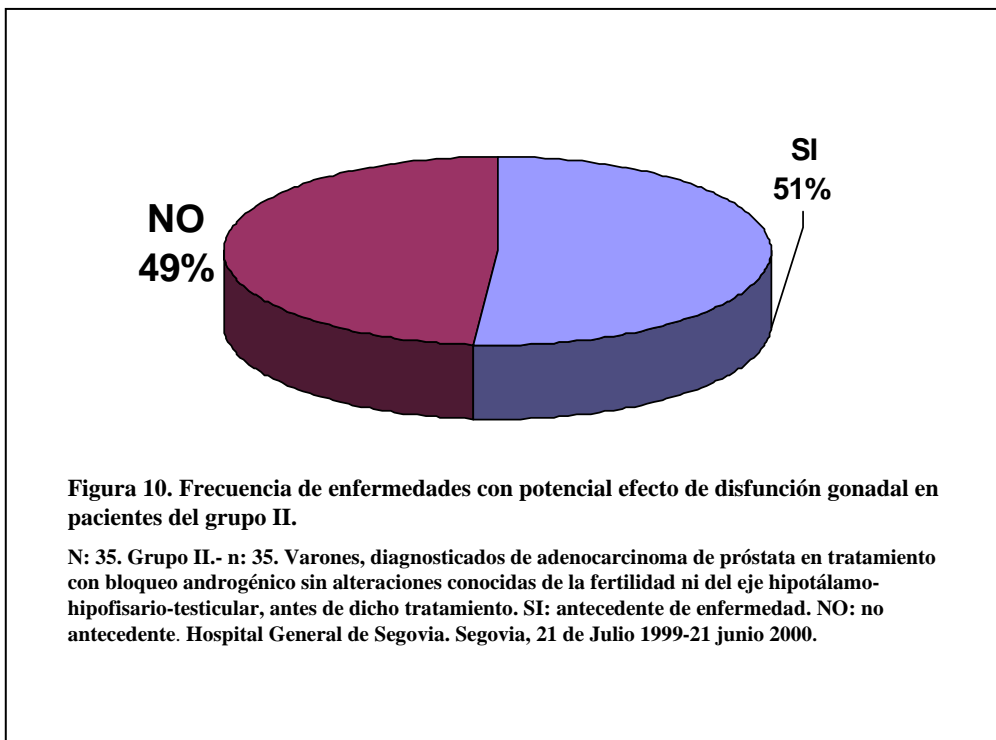
Figura 8. Frecuencia del motivo de consulta en pacientes del grupo II.

N: 35. Grupo II.- n: 35. Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni de eje hipotálamo-hipofisario-testicular, antes de dicho tratamiento. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

En el grupo bloqueado tenían algún antecedente de enfermedad 31 pacientes, que supone el 89% de los pacientes del grupo. **Figura 9.**



En 15 pacientes de este grupo, alguna de las enfermedades crónicas, exceptuando la diabetes y obesidad, podía tener un potencial efecto en la espermatogénesis ó en los niveles de testosterona ó gonadotropinas.



Con relación a la patología endocrina, en el grupo II, diabetes mellitus la padecían 13 pacientes, asociada a obesidad en 2 y obesidad sin diabetes 4 enfermos. No tenían antecedentes de enfermedad endocrina de ningún tipo 18 pacientes.

Al contemplar las enfermedades crónicas con potencial disfunción endocrina gonadal 2ª y las enfermedades endocrinas, diabetes con/sin obesidad, hubo 18 pacientes del grupo II que padecían alguna enfermedad con potencial afectación del eje HT-HF-Testicular. **Figura 10.**

En el grupo II, 30 pacientes, el 86%, tomaban medicación por diversos motivos, siendo el número de fármacos administrados entre 1 y 5; promedio 2.3; desviación estándar 1.08; mediana 2.

En 11 pacientes, el 31% de este grupo que seguían tratamiento con bloqueo androgénico, se detectó ingesta de fármacos con potencial efecto de disfunción gonadal, predominando los antihipertensivos, tomados por 5 pacientes y psicofármacos, tomados por 4.

Se ha explorado a todos los pacientes sin detectar alteraciones que hiciesen sospechar hipogonadismo prepuberal ó endocrinopatías distintas a la secundaria al tratamiento antiandrogénico. Todos los pacientes presentaban signos de hipogonadismo postpuberal ó tardío.

Las enfermedades con potencial efecto de disfunción gonadal más frecuentemente padecidas por los pacientes de ambos grupos fueron la diabetes mellitus, la hipertensión arterial y las neoplasias. **Tabla IV y tabla V.**

Los demás medicamentos administrados en el resto de los pacientes de ambos grupos comprenden 70 fármacos distintos que se incluyen en 26 grupos farmacológicos. Los fármacos de ingestión más frecuente han sido los

<u>Enfermedad</u>	Grupo II	Grupo I
HTA	6	6
IRC	2	0
Neoplasia	4	1
Enfermedad de Cronh	0	1
Colitis ulcerosa	0	1
TBC	0	1
EPOC	3	3
Asma	0	2
Hipercolesterolemia	2	0
Artritis reumatoide	1	0
Espondilitis anquilopoyética	1	0
Cirrosis etélica	0	1
Obesidad	3	0
Diabetes Mellitus	12	5
Diabetes y obesidad	2	2
Anemia falciforme	1	0

**Tabla IV. Enfermedades con potencial disfunción gonadal secundaria y número de pacientes afectados en cada grupo de cada una de ellas.**

N: 70. Grupo I.- n: 35. Varones adultos sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Grupo II.- n: 35. Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

	Grupo II	Grupo I
SI	18	20
NO	14	15

**Tabla V. Número de pacientes afectados en cada grupo de patología con potencial disfunción gonadal secundaria.**

N: 70. Grupo I.- n: 35. Varones adultos sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Grupo II.- n: 35. Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento. SI : presencia de patología. NO: no patología. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

antiinflamatorios no esteroideos, seguido de los antibióticos, los antagonistas H2, antiagregantes y broncodilatadores no corticoides, inhibidores de la bomba de

protones, heparinas de bajo peso molecular, alfa-bloqueantes uroselectivos, antiácidos, antiparkinsonianos, hipocolesterolemiantes, vasodilatadores periféricos, glucósidos digitálicos, vasodilatadores cardiacos, laxantes, parasimpaticolíticos, inhibidor de la 5 alfa reductasa, antiarritmicos, anticoagulantes, propulsivos digestivos, hipocitratúricos y un pequeño grupo de fármacos no clasificables.

### Tratamiento antiandrogénico Grupo II

Los 35 pacientes del grupo II participantes del estudio seguían tratamiento antiandrogénico.

En 30 pacientes este tratamiento consistía en bloqueo androgénico máximo con un agonista LHRH más un antiandrógeno y 5 pacientes sólo se administraban un agonista LHRH. **Tabla VI.**

	Flutamida	Bicalutamida	Acetato ciproterona
Goserelin Trimestral	1	2	4
Goserelin mensual	1		1
Triptorelina Trimestral	8	4	
Leuprolide mensual	2		2
Leuprolide trimestral	1	1	
Buserelina bimensual	3		

**Tabla VI. Número de pacientes que siguen cada tipo de tratamiento antiandrogénico.**

N: 35. Todos los pacientes del Grupo II. Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento. Primera fila: Antiandrógeno. Primera columna: Agonista LHRH. Intersección fila/columna: número de pacientes que sigue cada tratamiento. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

En los pacientes que sólo estaban tratados con un agonista LHRH, éste fue acetato de triptorelina en inyección intramuscular trimestral en una ocasión. Otros 2

pacientes se trataban con acetato de leuprolide en inyección mensual intramuscular y los 2 restantes con acetato de buserelin en inyección subcutánea bimensual.

Los pacientes que seguían tratamiento con bloqueo androgénico máximo eran tratados según diversas posibilidades dada la variación de fármacos agonistas LHRH y antiandrógenos.

El agonista LHRH utilizado fue acetato de triptorelina en 13 ocasiones, mediante administración intramuscular, presentación trimestral de 11.25 mg. en todas ellas.

El agonista LHRH acetato de goserelina fue el tratamiento utilizado en 9 pacientes, administrado de forma subcutánea, en 2 casos 3.6 mg. cada mes y en 7 casos 10.8 mg. cada tres meses.

El acetato de leuprorelina era el tratamiento seguido por 8 pacientes, administrado intrmuscularmente, en dosis de 7.5 mg mensuales en 7 casos y 22.5 mg trimestrales en un caso.

El acetato de buserelina fue el agonista LHRH utilizado en 5 enfermos, mediante inyección subcutánea, de 6.6 mg. cada dos meses.

El antiandrógeno asociado al tratamiento fue flutamida en dosis de 250 mg. cada 8 horas en 15 pacientes, bicalutamida 50 mg diarios en 8 enfermos y acetato de ciproterona 100 mg. dos veces al día en otros 7 casos.

Los meses de duración del tratamiento antiandrogénico comprendieron entre 6 el paciente que menos y 104 meses el paciente que más tiempo llevaba en tratamiento. El promedio fue de 30.94 meses, desviación estándar 25.30, mediana 22 meses.



### **Nivel Inhibina B y Razón Inhibina B/FSH**

En el grupo II el nivel de inhibina B se ha comprendido entre 15,6 y 593 pg/ml, media 203,68 pg/ml; DE 209,08.

En el grupo I dicha determinación ha variado entre 15,6 y 189,5 pg/ml, media 64,63; DE 47,62.

La diferencia media entre los niveles en suero de inhibina B en ambos grupos ha sido de 139,05 pg/ml,  $p < 0,001$  (IC 95%).

La razón inhibina B/FSH en el grupo II se ha encontrado en el rango 1,45-331,28 pg/mUI, media 68,20; DE 87,56 .

Esta razón en el grupo I ha oscilado entre 0,29 y 47,71 pg/mUI, media 10,21; DE 11,06.

La diferencia media entre la razón inhibina B /FSH en ambos grupos ha sido de 57,99,  $p < 0,001$  (IC 95%).

El nivel de inhibina B y de la razón Inhibina B/FSH en los pacientes del grupo II y del grupo I, en relación al máximo, mínimo, media, desviación estándar, mediana se muestra en la **Tabla VII**.

La comparación entre los niveles de inhibina B y Ratio Inhibina B/FSH en ambos grupos se expone en la **Tabla VIII**.

Al calcular los percentiles 10-90 de los niveles de Inhibina B en el grupo I ó control, el percentil 10 se ha situado en 17,68 pg/ml y el percentil 90 se han situado en 125,7 pg/ml .

En el grupo II, el 51% de los pacientes tuvieron niveles de Inhibina B por encima del percentil 90 de los pacientes control, ó grupo I. **Figuras 11, 12, 13.**

	Inhibina B (pg/ml)		Razón Inhibina B/FSH (pg/mUI)	
	Grupo II	Grupo I	Grupo II	Grupo I
Máximo	593	189,5	331,28	47,71
Mínimo	15,6	15,6	1,45	0,29
Media	203,68	64,63	68,20	10,21
DE	209,08	47,62	87,56	11,06
Mediana	135,8	45,1	33,52	6,39

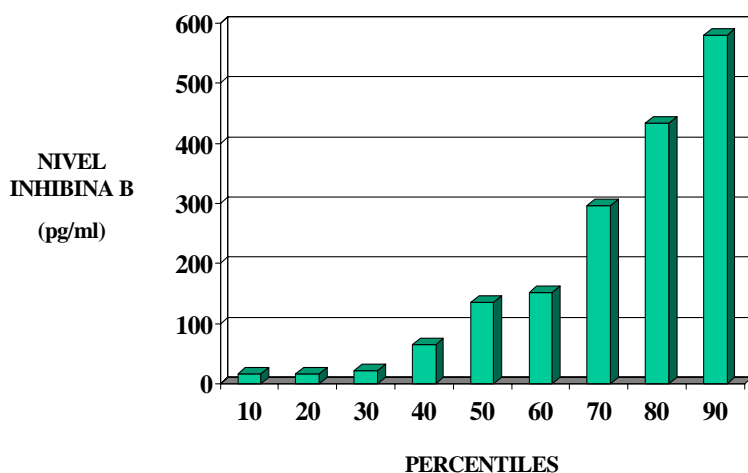
Tabla VII. Niveles de inhibina B y razón inhibina B/FSH en el grupo I y el grupo II.

N: 70. Grupo II. N 35: Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento. Grupo I: Varones, adultos, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Pg/ml: picogramos por mililitro. FSH: Hormona foliculoestimulante. DE: desviación estándar. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

	MEDIA		DIFERENCIA MEDIA (IC 95%)	p
	Grupo II	Grupo I		
Inhibina B (pg/ml)	203,68	64,63	139,05 (68,13-209,96)	<0,001
Razón Inhibina B/FSH	68,20	10,21	57,99 (27,41-88,56)	0,001

Tabla VIII. Diferencias apareadas inhibina B y razón inhibina B/FSH.

N: 70. Grupo II. N 35: Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento. Grupo I: Varones, adultos, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. mUI/ml: miliunidades internacionales por mililitro. Pg/ml: picogramos por mililitro. FSH: Hormona foliculoestimulante. IC: intervalo de confianza. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.



**Figura 11. Percentiles del nivel de inhibina B en pacientes del grupo II.**

N: 35. Grupo II.- n: 35. Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, antes de dicho tratamiento. pg/ml: picogramos por mililitro. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

El 51% de los pacientes del grupo II que presentaban niveles de Inhibina B superiores al percentil 90 del grupo I, tenían una razón inhibina B/FSH de 122,03 (error típico 21,81), aquellos con nivel de inhibina B entre los percentiles 10-90, de 12,53 (error típico 3,91) y dicha razón era de 3,81 (error típico 0,44) en caso de niveles de inhibina B por debajo del percentil 10 del otro grupo. La diferencia en la razón de inhibina B/FSH entre el 51% de los pacientes del grupo II con niveles de inhibina B superiores al percentil 90 del grupo I y el resto de los pacientes de este grupo tuvo una significación de 0,000.

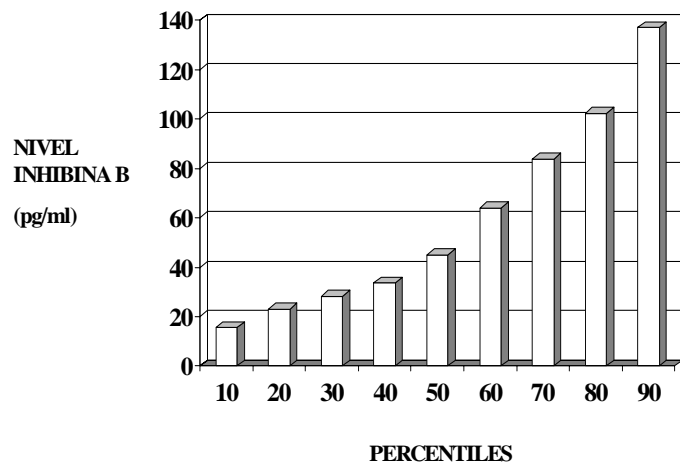


Figura 12. Percentiles del nivel de inhibina B en pacientes del grupo I.

N: 35. Grupo I- n: 35. Varones adultos sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Pg/ml: picogramos por mililitro. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

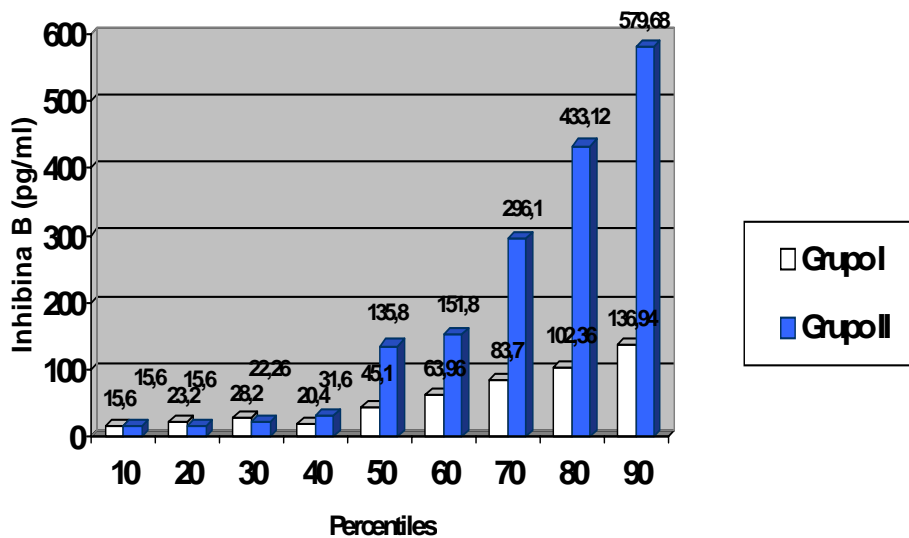


Figura 13. Comparación en los percentiles de Inhibina B entre los pacientes del grupo I y del grupo II. N: 70.

Grupo II- n: 35. Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, antes de dicho tratamiento. Grupo I- n: 35. Varones adultos sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Pg/ml: picogramos por mililitro. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

## Determinaciones hormonales

Se realizaron en todos los pacientes del estudio. Los niveles detectados, máximo, mínimo, media, desviación estándar y mediana en ambos grupos se muestran en las **tablas IX y X**.

	<b>FSH</b> (mUI/ml)	<b>LH</b> (mUI/ml)	<b>TT</b> (ng/ml)	<b>PRL</b> (ngml)	<b>TSH</b> (microUI/ml)	<b>E2</b> (pg/ml)
<b>Máximo</b>	11,63	0,4	0,94	53,46	10,2	23,68
<b>Mínimo</b>	1,65	0,1	0,02	4,43	0,37	10
<b>Media</b>	4,51	0,1	0,06	14,18	14,18	14,40
<b>DE</b>	0,28	0,009	0,15	10,77	10,77	4,23
<b>Mediana</b>	3,67	0,1	0,02	10,88	10,88	13,05

**Tabla IX. Niveles hormonales en suero. Técnica ECLIA. Grupo II.**

N: 35. Todos los pacientes del grupo II. Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento. mUI/ml: miliunidades internacionales por mililitro. Ng/ml: nanogramos por mililitro. MicroUI/ml: microunidades internacionales por mililitro. Pg/ml: picogramos por mililitro. FSH: Hormona foliculoestimulante. LH: hormona luteinizante. TT: testosterona total. PRL: prolactina. E2: estradiol. TSH: Hormona estimulante del tiroides. DE: desviación estándar. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

	<b>FSH</b> (mUI/ml)	<b>LH</b> (mUI/ml)	<b>TT</b> (ng/ml)	<b>PRL</b> (ngml)	<b>TSH</b> (microUI/ml)	<b>E2</b> (pg/ml)
<b>Máximo</b>	52,98	32,73	8,44	40	4,13	93
<b>Mínimo</b>	2,28	1,84	1,3	0,47	0,12	2,83
<b>Media</b>	10,69	5,72	3,36	12,42	1,59	31,07
<b>DE</b>	9,35	5,49	1,71	7,92	0,91	15,56
<b>Mediana</b>	8,1	3,76	2,77	11	1,53	27,34

**Tabla X. Niveles hormonales en suero. Técnica ECLIA. Grupo I.**

N: 35. Todos los pacientes del grupo I. Varones, adultos, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. mUI/ml: miliunidades internacionales por mililitro. Ng/ml: nanogramos por mililitro. MicroUI/ml: microunidades internacionales por mililitro. Pg/ml: picogramos por mililitro. FSH: Hormona foliculoestimulante. LH: hormona luteinizante. TT: testosterona total. PRL: prolactina. E2: estradiol. TSH: Hormona estimulante del tiroides. DE: desviación estándar. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

### Grupo II

En el grupo II todos los pacientes tenían un nivel de FSH dentro del valor de referencia. El 100% de los pacientes de este grupo tenía niveles de LH inferiores al valor de referencia, el 94.3%, 33 pacientes, igual ó inferiores a 0.10 mUI/mL y 2 pacientes entre 0.13 y 0.14 mUI/mL.

El 100% de los pacientes de este grupo tenían el nivel de testosterona total sérica por debajo del nivel de referencia, 2.8 ng/ml., estando 20 enfermos, 57.14%, con niveles inferiores a 0.02 ng/ml. Uno de los pacientes tenía un nivel de testosterona sérica ligeramente superior al nivel de castración 0,90 ng/ml.

Ningún paciente del grupo bloqueado tuvo un nivel de Prolactina inferior al valor de referencia del laboratorio de 4.1 ng/ml. En 9 pacientes, 25.71% de este grupo, se observó un nivel superior al de referencia.

En uno de los pacientes, 2.9% del total, el nivel de TSH estaba por debajo del nivel de referencia normal, 0.45 microUI/mL. Otro paciente, 2.9% del total, tenía un nivel por encima del de referencia normal, 5 microUI/mL .

En 18 pacientes, 51.42% del total de pacientes bloqueados, el nivel de estradiol se encontraba por debajo del valor de referencia normal. Un paciente que seguía tratamiento con Fosfato de Estramustina presentó niveles de estradiol de 3102 pg/ml, muy elevados por dicho tratamiento.

### Grupo I

En el grupo I ningún paciente tuvo niveles de FSH inferiores al de referencia. En 8 pacientes, 22.85%, el nivel era superior al valor de referencia. En este mismo grupo ningún paciente tuvo nivel de LH inferior al valor de referencia. El 11.6%, 4 pacientes, tenían niveles superiores al mismo.

En 17 pacientes, 48.57% de este grupo, el nivel de testosterona total era inferior al valor de referencia, 2.8 ng/ml.. En un paciente estaba ligeramente por encima del valor de referencia, 8 ng/ml.

El nivel de prolactina en sangre estuvo en 3 casos, 8.57 % del grupo, inferior al de referencia de 4.1 ng/ml.y en 5, 14.28%, fue superior, en este grupo de pacientes.

Con relación a la TSH, en dos pacientes, 5.8%, el nivel estaba por debajo del nivel de referencia, 0.45 microUI/mL Ningún paciente tenía un nivel superior al valor superior de referencia.

Hubo un paciente, 2.9% de su grupo, que tenía niveles de estradiol inferiores al valor de referencia. En dos pacientes, 5.8%, se detectó un nivel superior al mismo.

El nivel sérico de FSH en el grupo II tuvo una media de 4,56 mUI/ml, y en el grupo I de 10,87 mUI/ml, siendo la diferencia media entre ambos grupos de – 6,31,  $p < 0,001$  (IC 95%). La media de LH en el grupo II fue de 9,94E-02 y en el grupo I de 5,78 mUI/ml, diferencia media –5,68,  $p < 0,001$  (IC 95%). El nivel de Testosterona total en el grupo II presentó una media de 6,52E-02 ng/ml y en el grupo I de 3,40 ng/ml, diferencia media –3,33,  $p < 0,001$  (IC 95%).

La diferencia media entre ambos grupos de prolactina fue 2,52 ng/ml,  $p$  0,43 (IC 95%), de estradiol 73,84 pg/ml,  $p$  0,43 (IC 95%) y de TSH 0,37 microUI/ml,  $p$  0,28 (IC 95%).

La comparación y las diferencias apareadas de los niveles hormonales entre ambos grupo se muestra en la **Tabla XI**.

	Media		Diferencia Media (IC 95%)	p
	Grupo II	Grupo I		
FSH (mUI/ml)	4,56	10,87	-6,31 (-9,55- -3,08)	<0,001
LH (mUI/ml)	9,94E-02	5,78	-5,68 (-7,62- -3,74)	<0,001
TT (ng/ml)	6,52E-02	3,40	-3,33 (-3,94- 2,73)	<0,001
PRL (ng/ml)	14,33	11,81	2,52 (-2,44- -7,49)	0,31
E2 (pg/ml)	105,35	31,5	73,84 (-112,78- 260,46)	0,43
TSH (microUI/ml)	1,95	1,58	0,37 (-0,32-1,06)	0,28

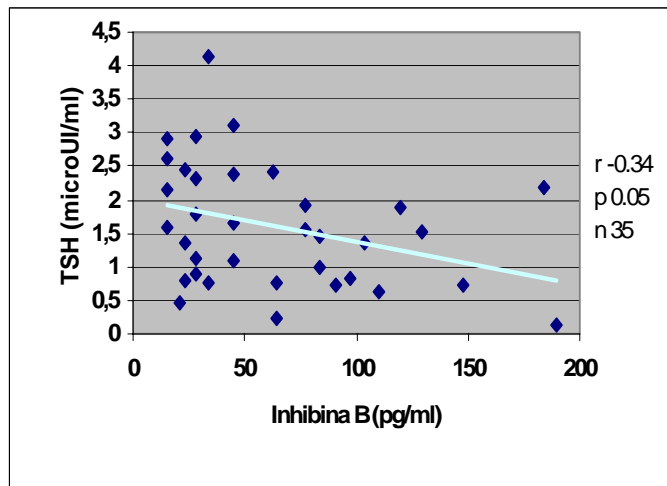
**Tabla XI. Diferencias apareadas en los niveles hormonales entre el grupo I y el grupo II.**

N: 70. Grupo II. N35: Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento. Grupo I: Varones, adultos, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. mUI/ml: miliunidades internacionales por mililitro. Ng/ml: nanogramos por mililitro. MicroUI/ml: microunidades internacionales por mililitro. Pg/ml: picogramos por mililitro. FSH: Hormona foliculoestimulante. LH: hormona luteinizante. TT: testosterona total. PRL: prolactina. E2: estradiol. TSH: Hormona estimulante del tiroides. DE: desviación estándar. E-02= multiplicado por  $10^{-2}$ . IC: intervalo de confianza. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

### Correlación inhibina B y razón inhibina B/FSH con hormonas centrales y periféricas

En los pacientes del grupo I el coeficiente de correlación de Pearson de la inhibina B con FSH ha sido  $-0,14$ ,  $p 0,41$ . En la correlación entre inhibina B y LH, “r” ha sido igual a  $-0,24$ ,  $p 0,17$ . Cuando se ha correlacionado con prolactina, el coeficiente ha tenido un valor de  $-0,07$ ,  $p 0,67$ . En la misma, con TSH se ha obtenido un coeficiente de  $-0,34$ ,  $p 0,05$ . **Figura 14**

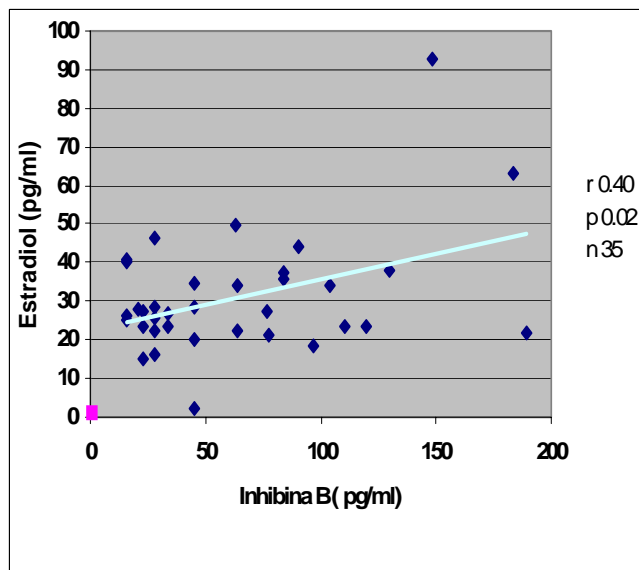




**Figura 14.** Correlación entre inhibina B y TSH en los pacientes del grupo I.

N: 35. Grupo I.- n: 35. Varones adultos sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Pg/ml: picogramos por mililitro. Micro UI/ml: microunidades internacionales por mililitro. TSH: hormona estimulante del tiroides. r: coeficiente de correlación de Pearson. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

Por último, la correlación con la testosterona total ha sido - 0,001, p 0,99 y con estradiol ha mostrado un coeficiente de 0,40, p 0,02 **Figura 15.**

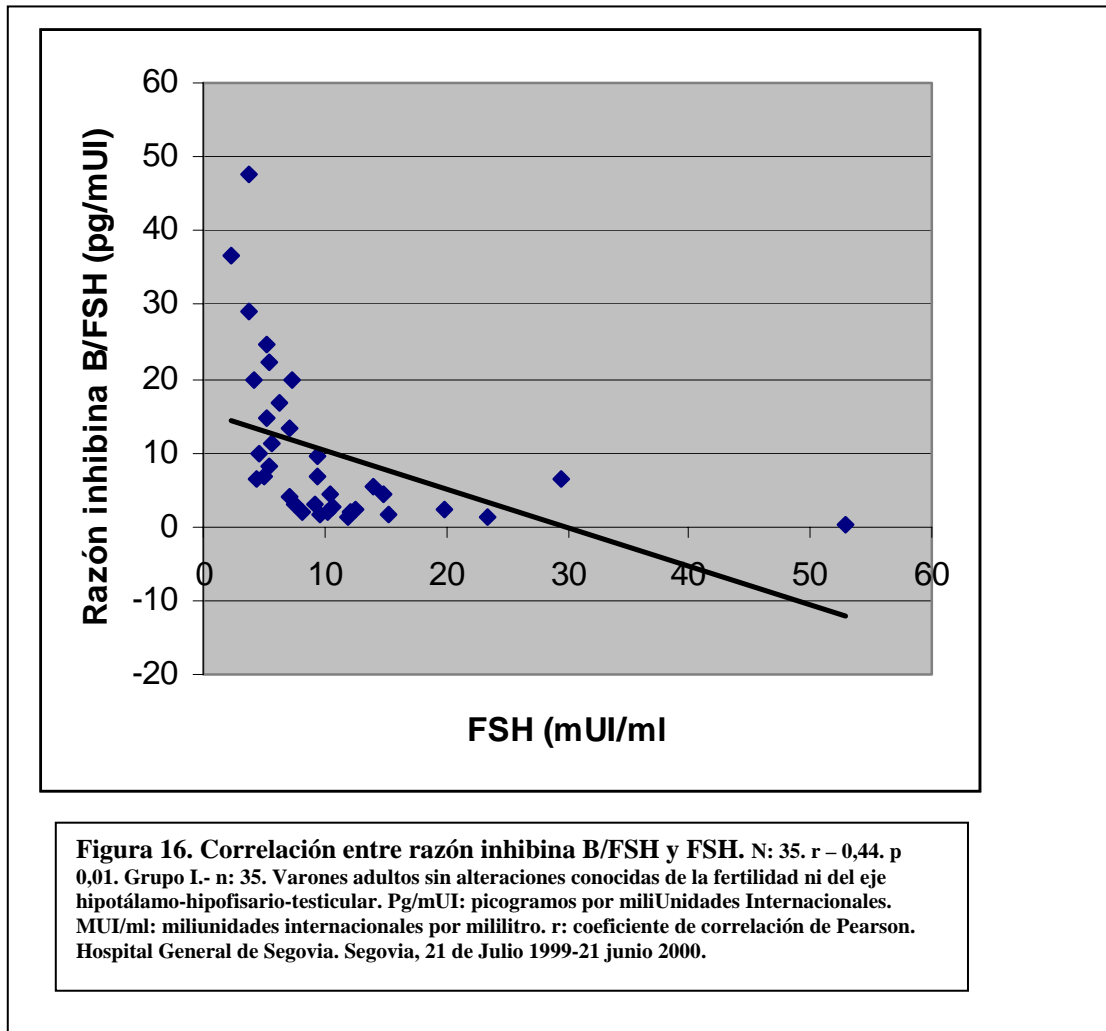


**Figura 15.** Correlación entre inhibina B con estradiol en los pacientes del grupo I.

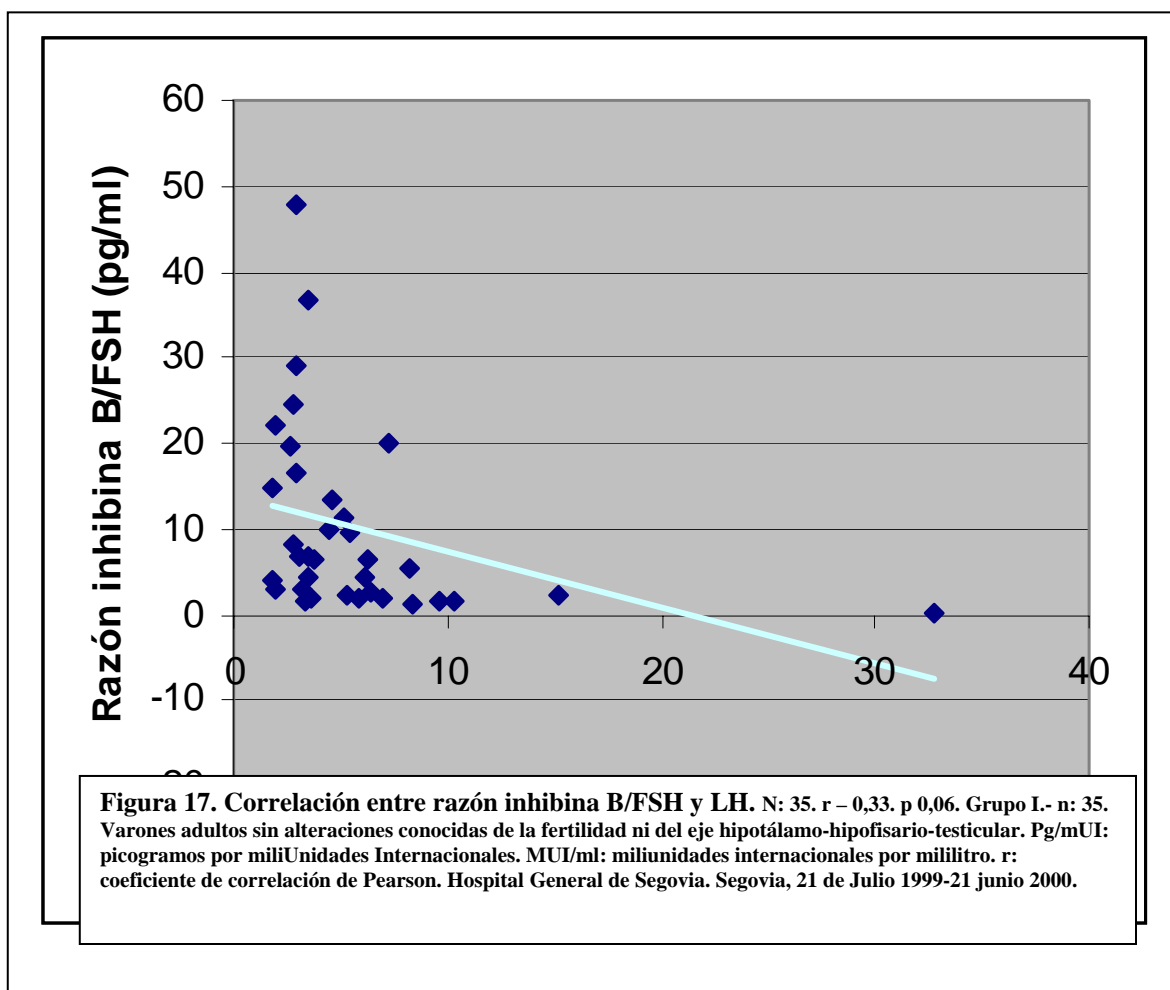
N: 35. Grupo I.- n: 35. Varones adultos sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Pg/ml: picogramos por mililitro. r: coeficiente de correlación de Pearson. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

## RESULTADOS

Dicho coeficiente de correlación entre razón inhibina B/FSH y FSH, LH, prolactina y TSH ha dado unos valores respectivos de  $-0,44$  ( $p 0,01$ ) **Figura 16**;  $-0,32$  ( $p 0,06$ ) **Figura 17**;  $0,00$  ( $p 0,98$ ) y  $-0,09$  ( $p 0,58$ ).



Cuando se ha determinado la correlación de la razón de inhibina B /FSH con testosterona total y estradiol el coeficiente ha sido respectivamente  $0,07$  ( $p 0,69$ ) y  $0,41$  ( $p 0,01$ ) **Figura 18**.

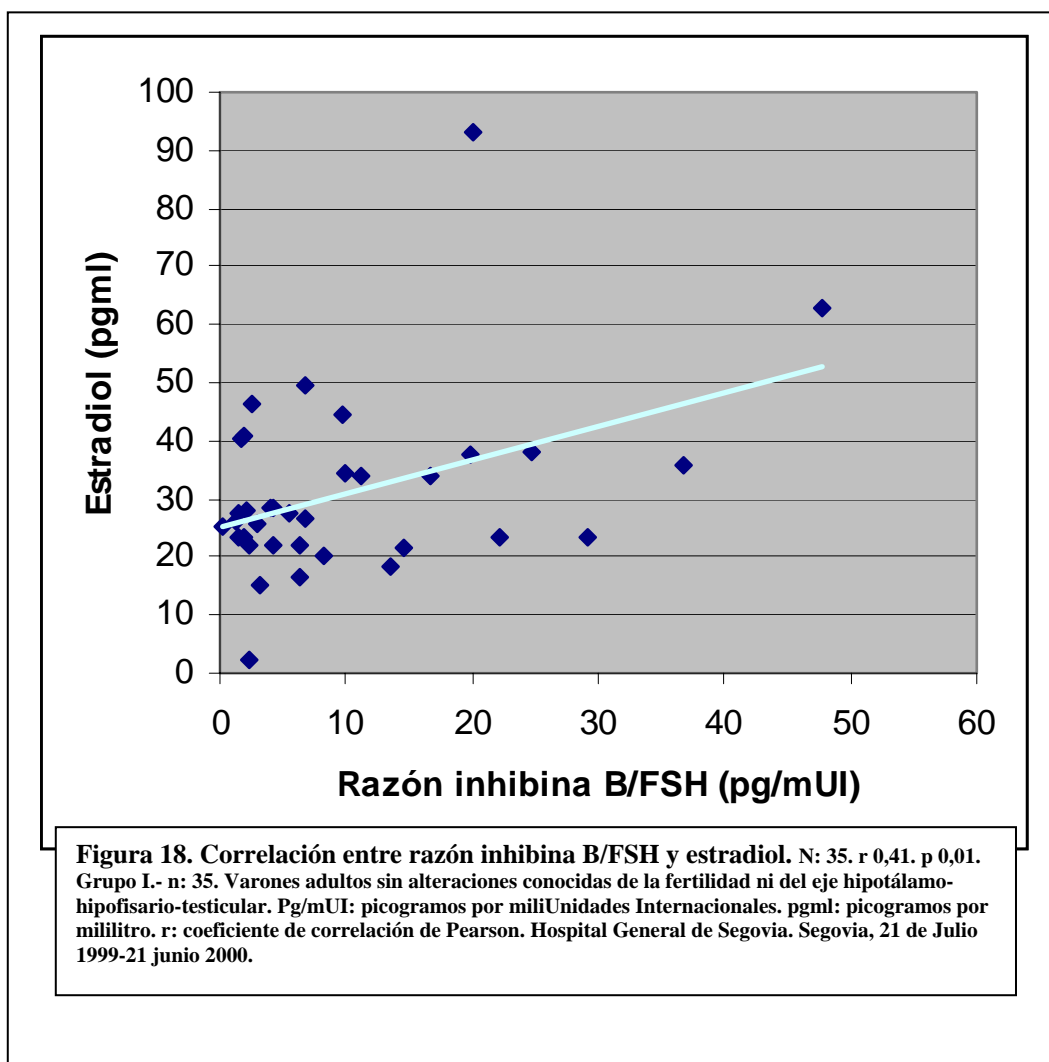


En los pacientes del grupo II, la correlación entre inhibina B y FSH, LH, prolactina y TSH ha mostrado un coeficiente respectivo de  $-0,13$  (p 0,45);  $0,15$  (p 0,38);  $0,06$  (p 0,75) y  $-0,04$  (p 0,82).

La correlación de Pearson de inhibina B con testosterona total y estradiol ha mostrado un coeficiente de  $-0,15$  (p 0,40) y  $-0,15$  (p 0,41).

La mencionada correlación entre razón inhibina B/FSH y FSH, LH, prolactina y TSH ha mostrado los siguientes y respectivos coeficientes:  $-0,43$  (p 0,01) **Figura 19**;  $0,08$  (p 0,67);  $0,12$  (p 0,48) y  $-0,17$  (p 0,33).

Cuando se han correlacionado aquella con testosterona total y estradiol los coeficientes han sido  $-0,11$  (p 0,54) y  $-0,13$  (p 0,47).

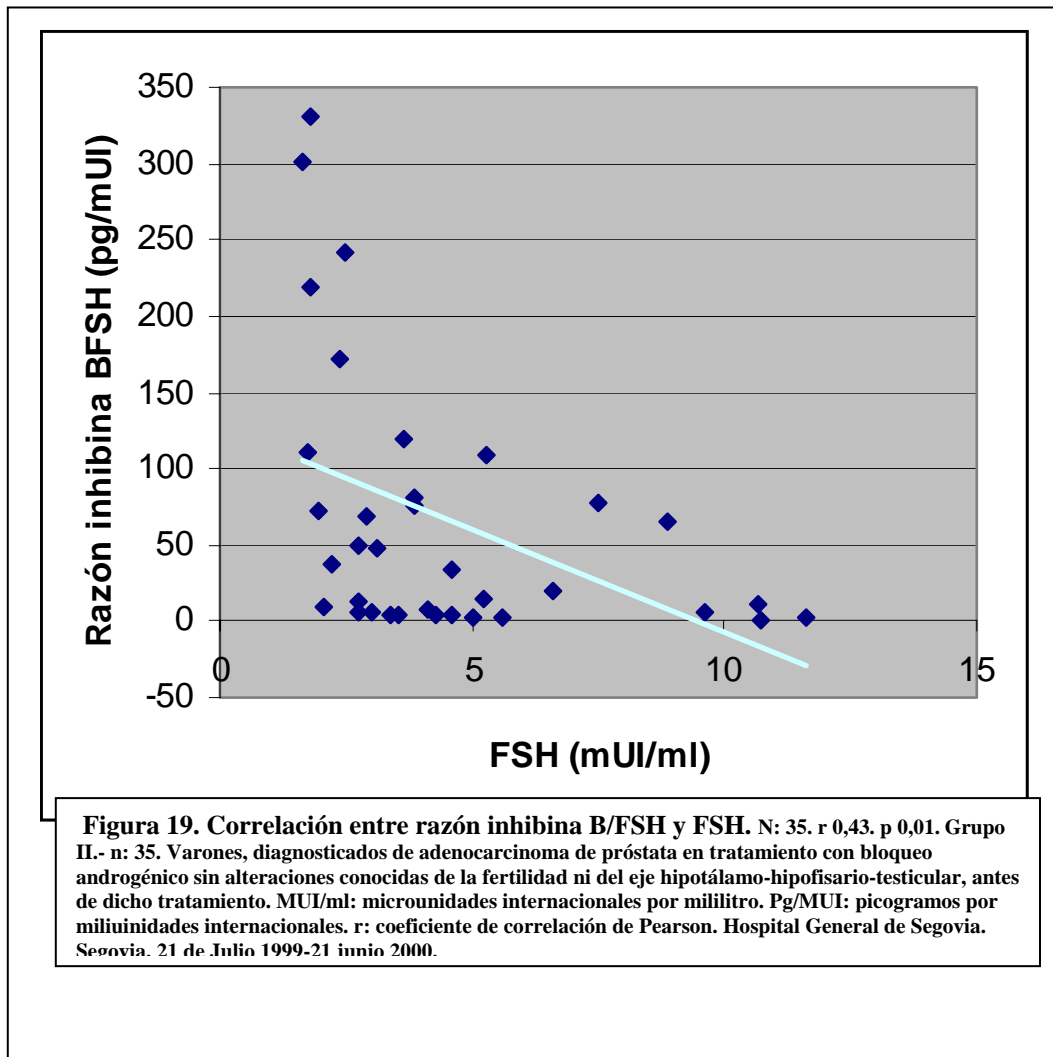


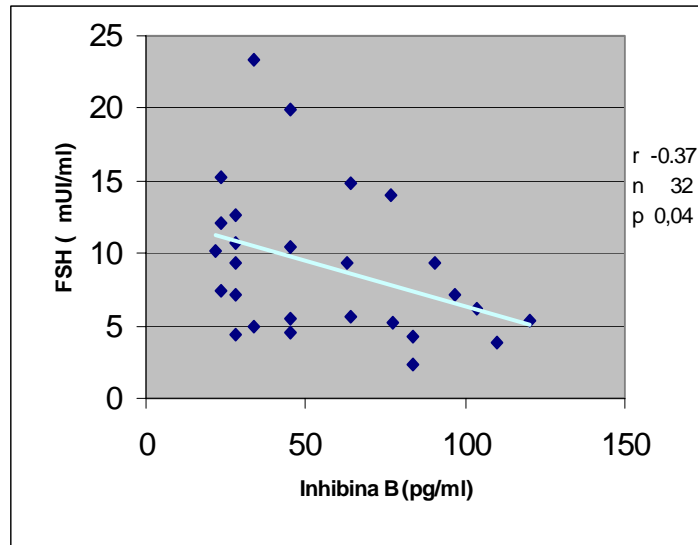
En el grupo I se ha determinado la correlación existente entre el nivel de inhibina B y FSH, LH, prolactina y TSH en los pacientes con niveles de inhibina entre los percentiles 10 y 90 de dicho grupo. El valor del coeficiente de correlación de Pearson ha sido respectivamente: - 0,37 (p 0,04) **Figura 20** ; - 0,33 (p 0,07) **Figura 21**; - 0,10 (p 0,57) y - 0,31 (p 0,09) **Figura 22**.

En estos mismos pacientes la correlación entre razón inhibina B / FSH con las hormonas hipofisarias mencionadas ha mostrado los coeficientes respectivos siguientes: - 0,47 (p 0,007) **Figura 23** ; - 0,36 (p 0,04) **Figura 24** ; - 0,10 (p 0,57) y -0,20 ( p 0,28). En el grupo II la correlación inhibina B con FSH, LH, prolactina, TSH, testosterona total y estradiol en estos percentiles ha sido 0,151 (p

## RESULTADOS

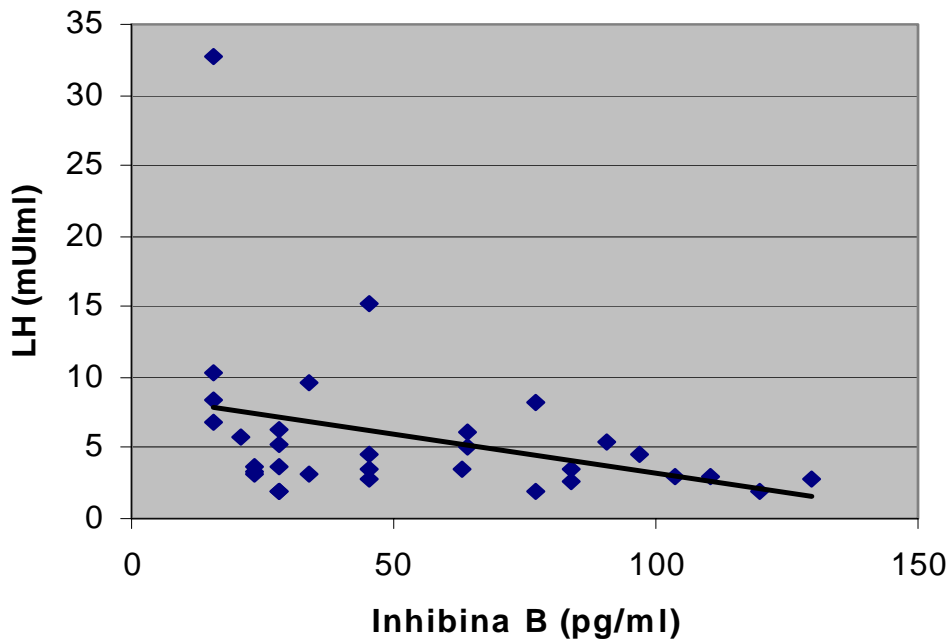
0,54); - 0,14 ( p 0,58); 0,38 ( p 0,11); 0,38 ( p 0,11), - 0,08 ( p 0,73) y - 0,12 ( p 0,62). En este mismo grupo y en estos mismos percentiles la correlación de la razón inhibina B/FSH con las hormonas anteriores ha sido - 0,32 ( p 0,18); - 0,10 ( p 0,68); 0,77 ( p 0,00); - 0,08 ( p 0,76); 0,03 ( p 0,90) y - 0,16 ( p 0,50).





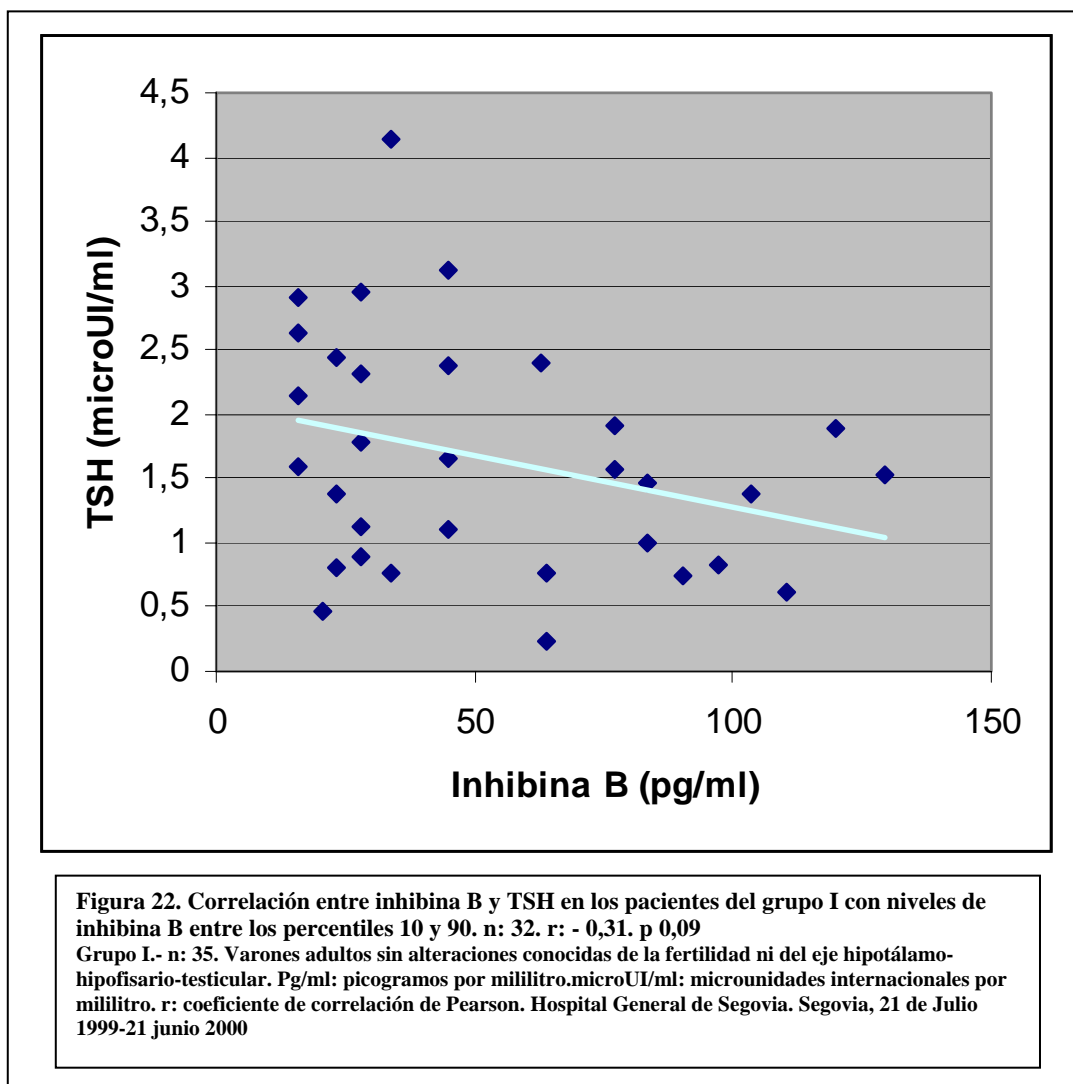
**Figura 20. Correlación entre inhibina B con FSH en los pacientes del grupo I con niveles de inhibina B entre los percentiles 10 y 90..**

N: 35. Grupo I.- n: 35. Varones adultos sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Pg/ml: picogramos por mililitro. Pg/MUI: picogramos por miliuinidades internacionales. r: coeficiente de correlación de Pearson. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.



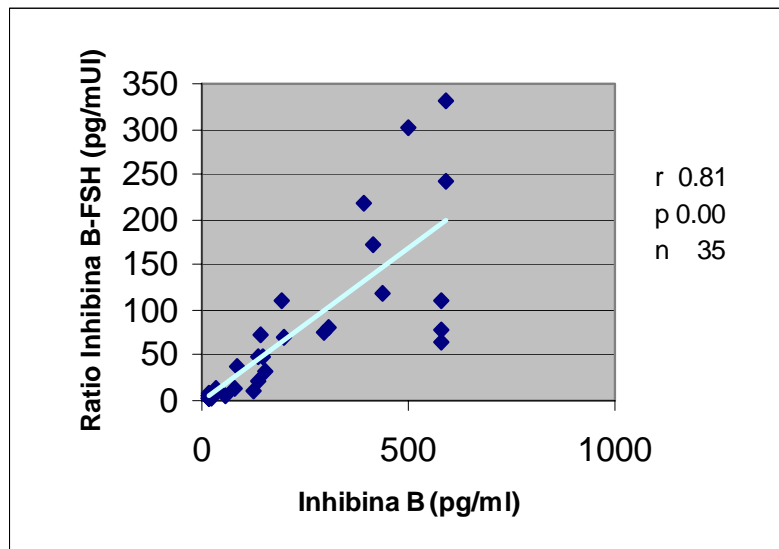
**Figura 21. Correlación entre inhibina B y FSH en los pacientes del grupo I con niveles de inhibina B entre los percentiles 10 y 90. n: 32. r: - 0,33. p 0,07**

Grupo I.- n: 35. Varones adultos sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Pg/ml: picogramos por mililitro.mUI/ml: miliuinidades internacionales por mililitro. r: coeficiente de correlación de Pearson. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000



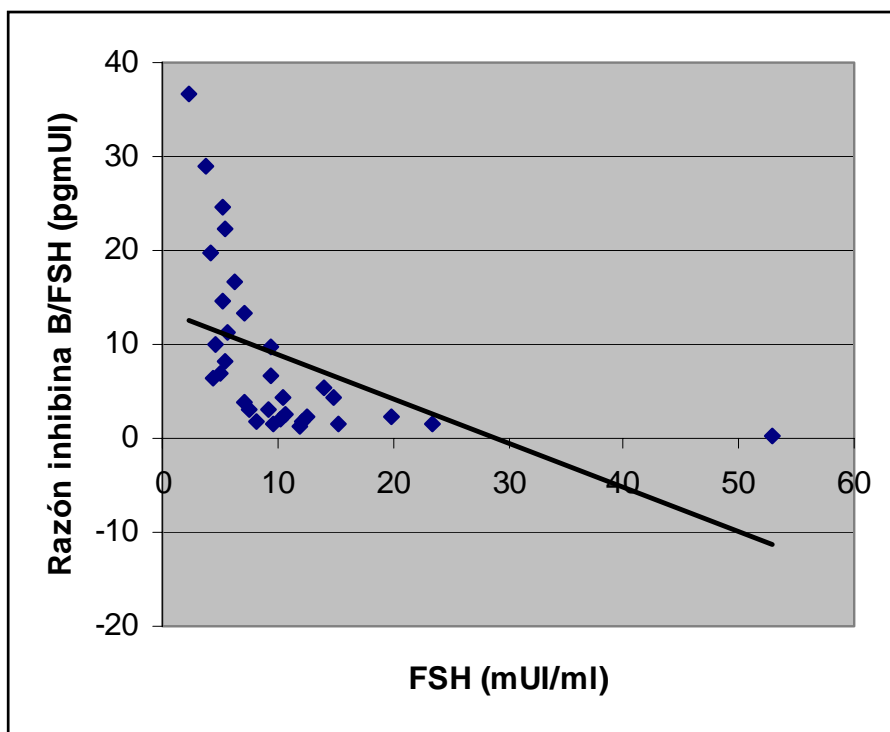
La correlación entre inhibina B y testosterona total y con estradiol ha sido respectivamente - 0,04 (p 0,83) y 0,13 (p 0,48). Cuando se han correlacionado estas hormonas gonadales con la razón inhibina B/FSH el coeficiente ha sido - 0,04 (p 0,81) y 0,16 (p 0,39) respectivamente.

La inhibina B ha mostrado un coeficiente de correlación de 0,81 (p 0,000) con razón inhibina B/FSH en pacientes del grupo II **Figura 25** y de 0,74 (p 0,000) en los del grupo I **Figura 26**.



**Figura 25. Correlación entre inhibina B y razón inhibina B-FSH en los pacientes del grupo II**

N: 35. Grupo II.- n: 35. Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, antes de dicho tratamiento. Pg/ml: picogramos por mililitro. Pg/MUI: picogramos por miliunidades internacionales. r: coeficiente de correlación de Pearson. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.



**Figura 23. Correlación entre razón de inhibina B-FSH y FSH en los pacientes del grupo I con niveles de inhibina B entre los percentiles 10 y 90. n: 32. r: - 0,47. p 0,01**

Grupo I.- n: 35. Varones adultos sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Pg/mUI: picogramos por miliunidades internacionales. .mUI/ml: miliunidades internacionales por mililitro. r: coeficiente de correlación de Pearson. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000



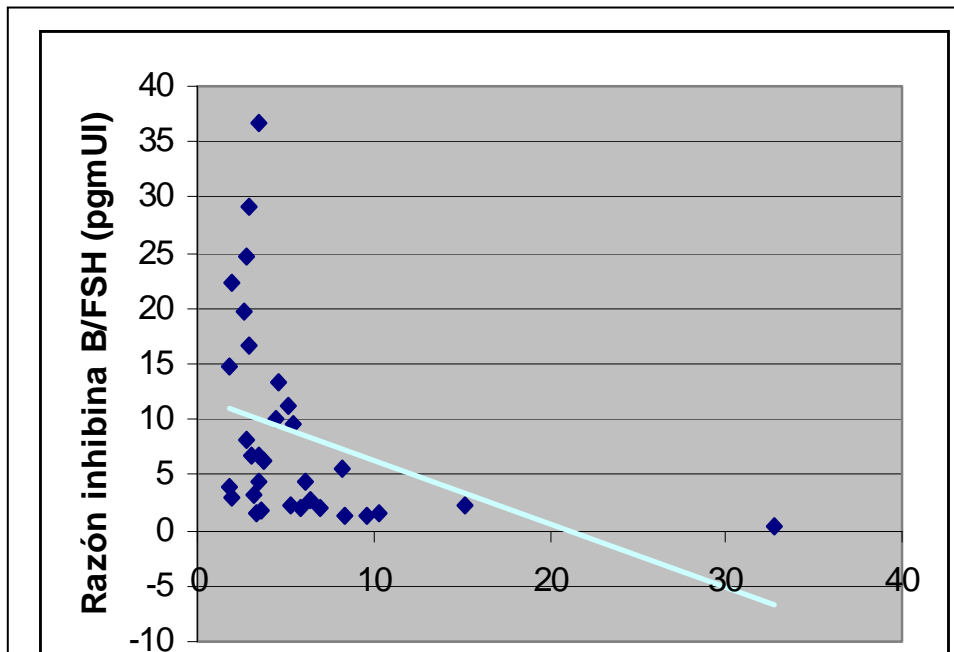


Figura 24. Correlación entre razón de inhibina B-FSH y LH en los pacientes del grupo I con niveles de inhibina B entre los percentiles 10 y 90. n: 32. r: - 0,36. p 0,04  
 Grupo I.- n: 35. Varones adultos sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Pg/mUI: picogramos por miliunidades internacionales. .mUI/ml: miliunidades internacionales por mililitro. r: coeficiente de correlación de Pearson. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000

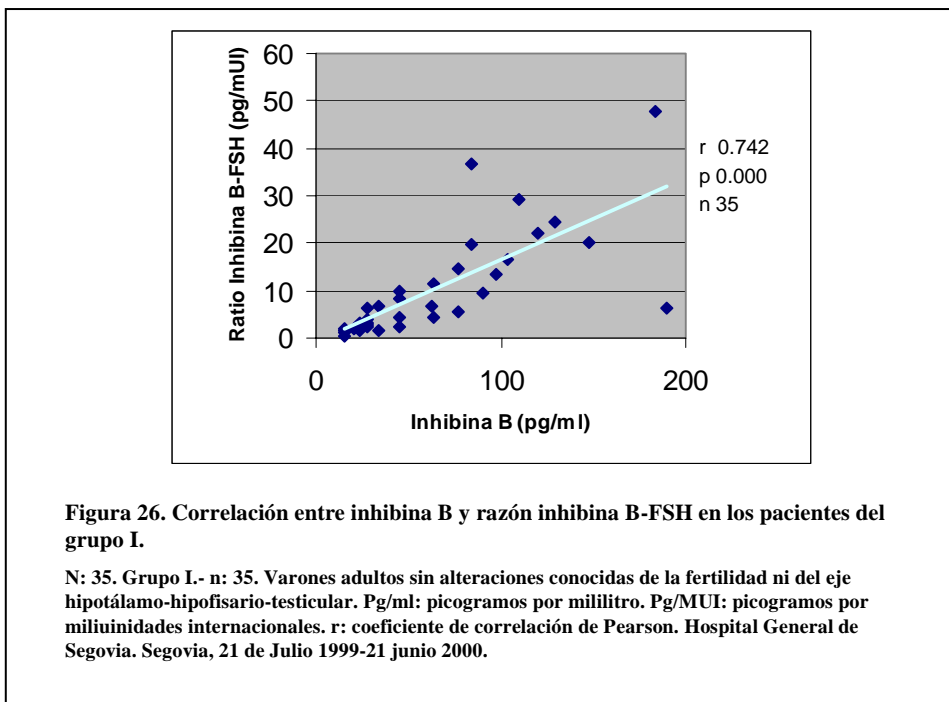
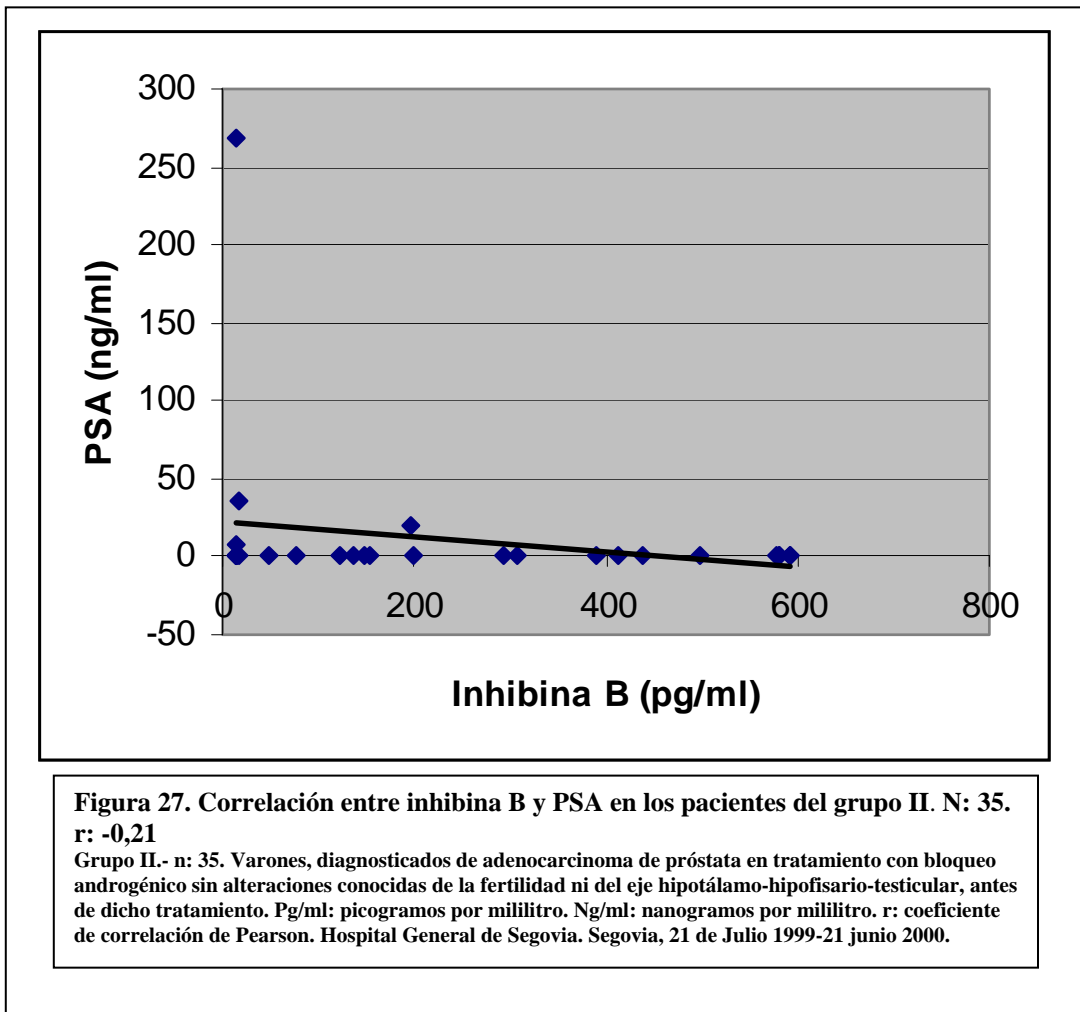


Figura 26. Correlación entre inhibina B y razón inhibina B-FSH en los pacientes del grupo I.

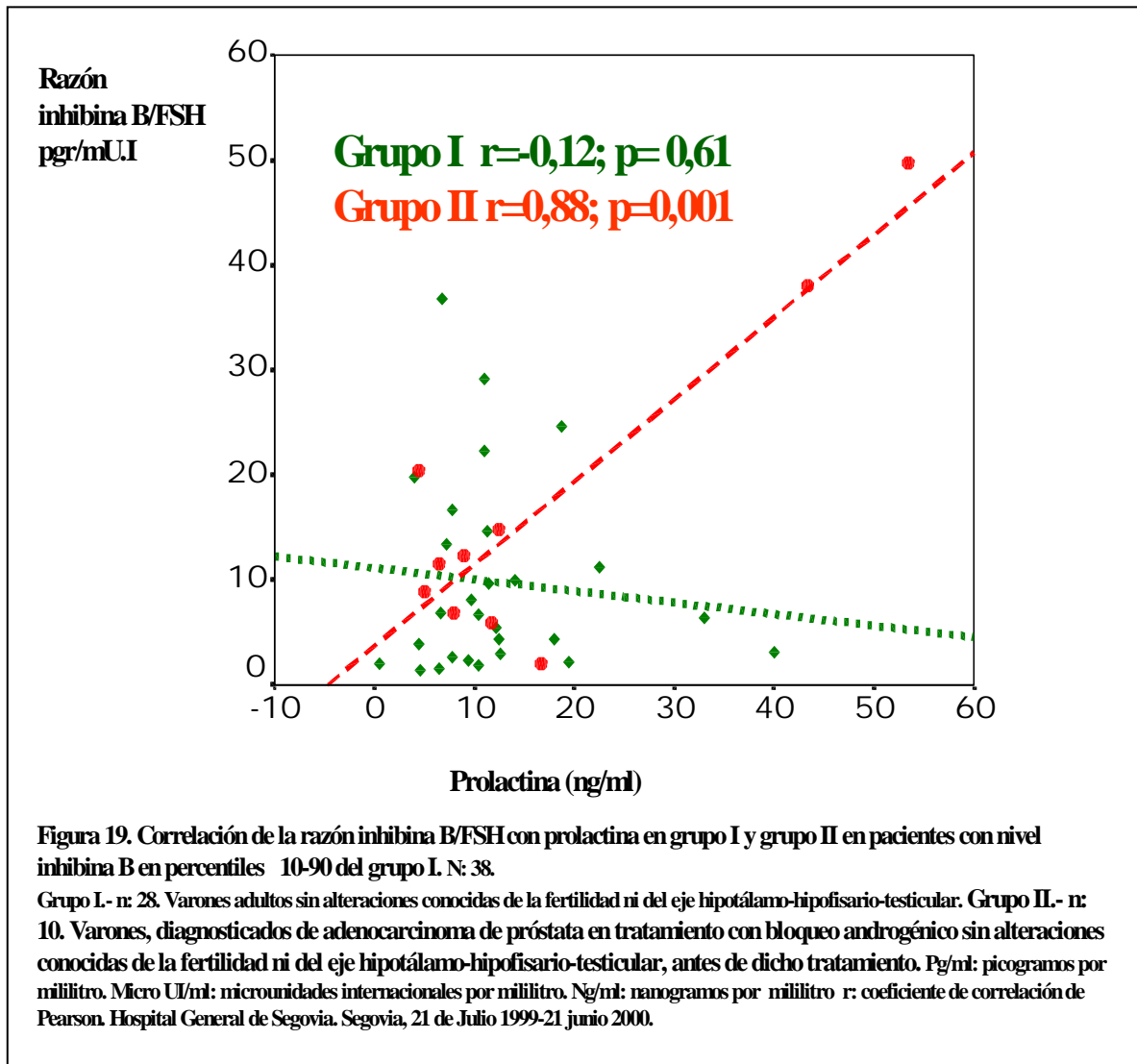
N: 35. Grupo I.- n: 35. Varones adultos sin alteraciones conocidas de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Pg/ml: picogramos por mililitro. Pg/MUI: picogramos por miliunidades internacionales. r: coeficiente de correlación de Pearson. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

El coeficiente de correlación entre inhibina B y PSA en los pacientes del grupo II ha sido - 0,21, **Figura 27**; y entre razón inhibina B/FSH y PSA su valor fue - 0,16.



Cuando se han correlacionado los pacientes de ambos grupos que tenían niveles de inhibina B entre los percentiles 10 y 90 de los pacientes del grupo I se ha apreciado una correlación de la razón inhibina B/FSH con la prolactina en los pacientes del grupo II, con un coeficiente de 0,88, p 0,001, n 10. Esta correlación en los pacientes del grupo I ha poseído un coeficiente de - 0,10, p 0,610, n 28.

**Figura 28.**



La correlación entre inhibina B y FSH, LH, testosterona total y razón inhibina B/FSH en el conjunto de los 70 pacientes participantes en el estudio ha mostrado un coeficiente de  $-0,21$ ;  $-0,27$ ;  $-0,32$  y  $0,83$  respectivamente.

La correlación entre razón inhibina B/FSH con FSH, LH, testosterona total e inhibina B tuvo un coeficiente “r” respectivo de  $-0,32$ ;  $-0,28$ ;  $-0,34$  y  $0,83$ .

## **Correlación inhibina B y razón inhibina B/FSH con exploración genital y determinaciones bioquímicas**

### Grupo II

La longitud del testículo derecho se ha determinado en 31 pacientes, habiendo oscilado entre 1 y 5 cm, con un promedio de 2.18 cm., desviación estándar 0.83, mediana 2 cm..

La anchura del teste derecho se determinó en 31 pacientes, oscilando entre 1 y 4 cm., promedio 1.43 cm., desviación estándar 0.71, mediana de 1 cm.

El volumen del testículo derecho estuvo entre 0.52 y 41.89 ml., promedio 4.16, Desviación estándar 8.29, mediana 1.05. La consistencia del testículo derecho ha sido normal en 24 pacientes, 77.42%, y disminuida en 7 individuos.

La longitud del testículo izquierdo, determinada en 31 casos, ha oscilado entre 1 y 5 cm., promedio de 2.16 cm., desviación estándar 0.84, mediana 2 cm.. La anchura del testículo izquierdo en los mismos pacientes osciló entre 1 y 4 cm., promedio 1.43 cm., desviación estándar 0.71, mediana 1 cm. La consistencia de este testículo fue normal en 24 pacientes, 77.42%, y disminuida en 7 de ellos. El volumen de este testículo estaba entre 0.52 y 41.89 ml., promedio 4.16, Desviación estándar 8.29, mediana 1.05. El volumen testicular total (VTT) varió de 1.04 a 83.78 ml., promedio 8.31, desviación estándar 16.58, mediana 2.1.

Ningún paciente presentó varicocele ni criptorquidia. En dos pacientes se detectó un discreto-moderado hidrocele unilateral.

La longitud y diámetro del pene se determinó en 31 pacientes. La longitud osciló entre 4 y 10 cm., promedio de 6.66 cm., desviación estándar 1.48, mediana 7 cm..

El diámetro estuvo comprendido entre 1 y 3 cm., promedio de 1.68 cm., desviación estándar de 0.51, mediana 1.5 .

## RESULTADOS

---

El coeficiente de correlación de Pearson entre el volumen testicular total y la inhibina B ha sido de 0,03 y con la razón de inhibina B/FSH  $-0,08$ .

El coeficiente de correlación de Pearson entre longitud de pene e inhibina B y razón inhibina B/FSH ha sido 0,29 y 0,28 respectivamente.

Las determinaciones bioquímicas se realizaron en todos los pacientes **Tabla XII**.

El nivel de colesterol estaba por encima del rango normal del laboratorio en el 54% de los pacientes estudiados del grupo II.

La creatinina sérica superó el nivel normal en el 51% de los pacientes de este grupo.

La glucemia estuvo elevada por encima del límite de normalidad del laboratorio en el 40% del grupo II.

	Colesterol (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Glucosa (mg/dl)	Proteínas totales (g/dl)	GOT (U/l)
Máximo	324	1,6	230	8,4	63
Mínimo	138	0,9	87	6,2	13
Media	205,65	1,2	129,77	7,41	24,49
DE	42,17	0,17	39,64	0,46	11,29
Mediana	203	1,2	113	7,5	22

**Tabla XII. Bioquímica sanguínea Grupo II.**

**N: 35. Todos los pacientes del grupo II. Varones, diagnosticados de adenocarcinoma de próstata en tratamiento con bloqueo androgénico, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes de dicho tratamiento. Mg/dl miligramos por decilitro. G/dl gramos por decilitro. U/l unidades internacionales por litro. DE: desviación estándar. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.**

El nivel de proteínas totales superó el normal en 3 pacientes del grupo II y la transaminasa glutaminocoxalacética se encontró elevada por encima del rango de

referencia del laboratorio en 4 pacientes del grupo II y, no superando en ningún caso niveles superiores a 2 veces el normal.

En el grupo II el coeficiente de correlación de Pearson entre creatinina e inhibina B y razón inhibina B/FSH ha sido de 0,20 y 0,05 respectivamente. Al determinarle para el colesterol fue de 0,00 y 0,08 respectivamente. En el caso de la glucosa el valor estuvo en 0,16 y 0,07 respectivamente. Este coeficiente respectivo para las proteínas totales y GOT fue 0,07 y 0,17 en un caso y -0,28 y -0,16 en el último.

### Grupo I

La longitud del testículo derecho estuvo comprendida entre 2 y 8 cm., promedio de 4.16 cm., desviación estándar 1.15, mediana 4.5 . La anchura de esta gónada osciló entre 1.5 y 5 cm., promedio 2.84 cm., desviación estándar 0.84, mediana 3 cm. La consistencia fue normal en 28 casos, que supone el 90.32% de los mismos, de los 31 pacientes en que se registró. El volumen tuvo valores entre 2.36 y 104.7 ml, promedio 21.6, desviación estándar 19.39, mediana 18.35.

La longitud del testículo izquierdo osciló entre 2 y 5 cm., promedio 4.09 cm., desviación estándar 0.92, mediana 4.5 . La anchura del mismo estuvo comprendida entre 1.5 y 4 cm., promedio 2.81 cm., desviación estándar 0.79, mediana 3 cm.. El volumen varió de 2.4 a 41.9 ml., promedio 19.85, desviación estándar 12.59, mediana 18.9. La consistencia fue normal en 29 casos, que supone el 93.55% de los mismos, de los 31 pacientes en que se registró.

El VTT estaba entre 4.72 y 136.77 ml, promedio 40.78, desviación estándar 29.12, mediana 37.8.

En ningún paciente se detectó varicocele ni criptorquidia. A tres pacientes se les detectó hidrocele unilateral ligero-moderado.

## RESULTADOS

Se determinó la longitud y anchura del pene en flaccidez en 31 pacientes. La longitud osciló entre 5 y 14 cm., promedio 7.48 cm., desviación estándar 2.17, mediana 7 cm.. La anchura midió entre 1 y 4 cm., promedio 2.02 cm., desviación estándar 0.68, mediana 2.

El coeficiente de correlación de Pearson del volumen testicular total y la inhibina B y la razón inhibina B/FSH ha dado unos valores respectivos de  $-0,05$  y  $-0,17$ .

El coeficiente de correlación entre longitud del pene y el nivel de inhibina B y la razón inhibina B/FSH fue  $-0,06$  y  $-0,05$  en cada caso.

Con respecto a las determinaciones bioquímicas, (**Tabla XIII**) el nivel de colesterol estaba por encima del rango normal del laboratorio en el 43% del grupo I. La glucemia estuvo elevada por encima del límite de normalidad del laboratorio en el 46% del grupo I. El nivel de proteínas totales superó el normal en 3 del grupo I. La transaminasa glutaminocoxalacética se encontró elevada por encima del rango de referencia del laboratorio en 2 del grupo I no superando en ningún caso niveles superiores a dos veces el normal. La creatinina sérica superó el nivel normal en el 57% del grupo.

	Colesterol (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Glucosa (mg/dl)	Proteínas totales (g/dl)	GOT (U/l)
Máximo	284	2,1	218	8,6	43
Mínimo	101	0,8	81	5,8	12
Media	197,5	1,25	121,59	7,19	22,15
DE	44,91	0,33	34,99	0,70	7,12
Mediana	195,5	1,2	109	7,3	21

**Tabla XIII. Bioquímica sanguínea Grupo I.**

N: 35. Todos los pacientes del grupo I. Varones, adultos, sin antecedentes conocidos de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular. Mg/dl miligramos por decilitro. G/dl gramos por decilitro. U/l unidades internacionales por litro. DE: desviación estándar. Hospital General de Segovia. Segovia, 21 de Julio 1999-21 junio 2000.

Cuando se ha correlacionado el nivel de inhibina B y la razón inhibina B/FSH con el nivel de las sustancias bioquímicas determinadas, el coeficiente de correlación ha sido superior a 0,20 en la correlación entre glucosa-razón inhibina B/FSH (0,23), proteínas totales-inhibina B (0,32) y en aquella entre GOT e inhibina B (0,28).

### **Efecto de gonadotóxicos, fármacos y enfermedad sistémica en niveles hormonales**

Se han comparado los niveles hormonales en pacientes que ingerían sustancias con potencial efecto gonadotóxico, tanto medicamentosas como adictivas, y en pacientes que sufrían alguna enfermedad con el mismo efecto potencial, con los niveles hormonales que no tenían esas características. También comparamos el perfil hormonal en pacientes sometidos a intervención quirúrgica en fecha reciente con relación al estudio, con aquéllos que no.

Las sustancias con potencial efecto tóxico gonadal recibidas por los pacientes han incluido: alcohol, cafeína, antihipertensivos, psicotropos, corticoides y salazopirina.

Las enfermedades con potencial efecto gonadotóxico padecidas por los pacientes han sido ya señaladas. **Tabla IV.**

Las intervenciones a las que han sido practicada han sido resección transuretral de próstata, ó de vejiga, prostatectomía suprapúbica, prostatectomía radical ó uretrotomía óptica.

En el grupo I, el nivel de TSH ha sido 1,87 microUI/ml en el subgrupo de los pacientes que tomaban alguna sustancia gonadotóxica ó tenían alguna enfermedad con potencial alteración del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal ó habían sido



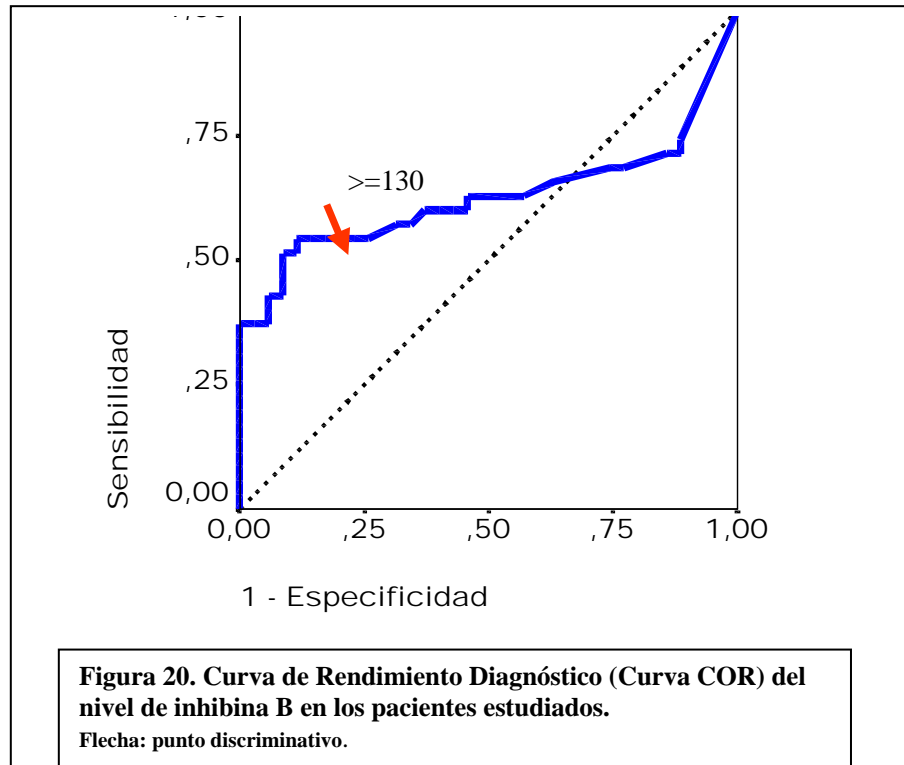
intervenidos quirúrgicamente en fecha reciente, y 1,07 microUI/ml en el subgrupo de los pacientes que no presentaban las anteriores características. La diferencia de medias ha sido de 0,79; p 0,012. En este mismo grupo la comparación entre ambos subgrupos de pacientes de la inhibina B, razón inhibina B/FSH, FSH, LH, Prolactina, testosterona total y estradiol ha mostrado una significación (bilateral) de 0,322; 0,346; 0,734; 0,258; 0,057; 0,489 y 0,302.

En el grupo II la comparación entre ambos subgrupos de pacientes de inhibina B, razón inhibina B/FSH; FSH; LH; prolactina; TSH; testosterona total y estradiol ha expresado una significación (bilateral) de 0,998; 0,732; 0,901; 0,399; 0,321; 0,925; 0,543 y 0,536 respectivamente.

Al comparar el perfil hormonal en pacientes que habían sido sometidos recientemente a un estrés quirúrgico con el de aquellos que no, la significación ha sido superior a 0,310 en ambos grupos de pacientes y para todas las hormonas y razón inhibina B/FSH, excepto en el caso de prolactina y TSH en el grupo I cuya significación estaba en valores de 0,097 y 0,079 respectivamente.

### **Validez de la Inhibina B**

La mejor relación de sensibilidad y especificidad del nivel de Inhibina B para detectar pacientes en tratamiento con bloqueo androgénico se ha observado en el punto de corte de 130 pg/ml. La sensibilidad ha sido del 51,4% y la especificidad del 91% en este nivel. El área bajo la curva fue de 0,63 (IC 95% 0,48- 0,77).



# **DISCUSSION**

En el estudio descriptivo y transversal que se presenta en esta Tesis Doctoral se han determinado los niveles de inhibina B, FSH, LH, TSH, prolactina, testosterona total y estradiol en suero a 70 pacientes. Además se ha calculado la razón inhibina B/FSH a estos pacientes. Un grupo de ellos, denominado grupo II, patológico ó bloqueado, presentaba un adenocarcinoma de próstata en tratamiento con agonistas LHRH, sin antecedentes de alteraciones de la fertilidad ni de afectación del eje hipotálamo-hipofisario-testicular antes del tratamiento indicado. Otro grupo, clasificado como grupo I, ó sano, son individuos controles, sin antecedentes de alteraciones de la fertilidad ni del eje hipotálamo-hipofisario-testicular, no tratados con agonistas LHRH. Hemos comparado dichos niveles en ambos grupos y se han correlacionado los niveles séricos de la inhibina B y razón inhibina B/FSH con las gonadotropinas y con las demás hormonas analizadas.

El equipo de inmunoensayo que hemos utilizado para la determinación de inhibina B sérica es un ELISA tipo sandwich fase sólida (**Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**), producido por Oxford Bio-Innovation <sup>122</sup>.

Este productor de este ensayo señala que es de elección, en el momento de recoger las muestras a analizar, que se usen en fresco ó que se congelen inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se almacenen hasta el ensayo. Diversos ciclos de descongelamiento no alteran los resultados del análisis pero no se recomienda. Las muestras extraídas a los pacientes participantes en la investigación que presentamos fueron almacenadas inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  después de ser recogidas, y transportadas en hielo seco hasta el laboratorio donde se realizaron las determinaciones.

El nivel de inhibina B en el grupo II ha sido significativamente superior al del grupo I, ( $p < 0,001$ ) . La FSH estaba significativamente reducida ( $p < 0,001$ ) en

aquel grupo debido al tratamiento con agonistas LHRH por el adenocarcinoma de próstata.

En los pacientes del grupo control de la investigación que se presenta, se ha manifestado una correlación inversa moderada y significativa entre los niveles en suero de la inhibina B y FSH, en los pacientes con niveles de inhibina B entre los percentiles p10-p90 (  $r: -0,37$ ;  $p 0,04$ ). Cuando se han incluido todos los pacientes del grupo no se ha apreciado una correlación significativa. En estos niveles de los pacientes del grupo control, se ha constatado uno de los elementos fundamentales de la hipótesis de la inhibina, como es la correlación inversa entre inhibina B y FSH.

En los pacientes del grupo II, con hipogonadismo hipogonadotrópico inducido por el tratamiento con análogos LHRH no se ha observado correlación entre Inhibina B y FSH en ningún caso.

La razón inhibina B/FSH ha sido significativamente superior ( $p 0,001$ ) en los pacientes en tratamiento con agonistas LHRH que en los controles no tratados, sugiriendo también que en estos pacientes existía una mayor actividad de las células de Sertoli.

La razón inhibina B/FSH ha mostrado una fuerte correlación positiva con la inhibina B en el grupo II ( $r 0,81$ ;  $p 0,000$ ) y en el grupo II ( $r 0,74$ ;  $p 0,000$ ) y moderada y negativa con la FSH tanto en el grupo II ( $r -0,43$ ;  $p 0,01$ ) como en el grupo I ( $-0,47$ ;  $p 0,01$ ).

Los pacientes que estaban en tratamiento con análogos LHRH que han sido estudiados con motivo de esta Tesis Doctoral no presentaban antecedentes de alteraciones de la fertilidad y el 91% tenían descendencia. El nivel de inhibina B en este grupo ha sido significativamente superior al nivel detectado en los

pacientes que no seguían tratamiento con análogos LHRH, en los cuales tampoco se detectó antecedentes de alteraciones de la fertilidad y el 97% tenía descendencia. Además el 50% de los enfermos del grupo II tenía un nivel de inhibina B superior al nivel del percentil 90 del grupo no tratado.

La exploración genital ha manifestado un volumen testicular significativamente reducido en los pacientes del grupo II respecto a los del grupo I ( $p < 0,000$ ), pero no se ha observado correlación entre éste y el nivel de inhibina B en ningún grupo. La longitud del pene no ha mostrado diferencias significativas entre ambos grupos.

En el grupo I ó control, el estradiol se ha correlacionado positivamente con la inhibina B ( $r < 0,40$ ;  $p < 0,02$ ), y con el ratio inhibina B/FSH ( $r < 0,41$ ;  $p < 0,01$ ).

Se ha apreciado una correlación negativa en los pacientes del grupo I, no en los del grupo II entre la inhibina B y la razón inhibina B/FSH, con la LH . Además la correlación ha sido más fuerte y más significativa cuando se han incluido solamente los pacientes con niveles de inhibina B entre los percentiles 10 y 90 ( $r = -0,33$ ;  $p < 0,06$ ).

Otra asociación detectada en los pacientes del grupo I ha sido una débil correlación inversa, entre Inhibina B y TSH, pero no acompañada de correlación con el ratio inhibina B/FSH, ni con los niveles de FSH. Esta asociación se mantiene cuando se analizan sólo los pacientes dentro de los percentiles 10-90 de inhibina B, pero desaparece en los pacientes del grupo II, que están tratados con análogos LHRH.

En los pacientes del grupo II se ha apreciado una correlación positiva entre aquellos dentro de los percentiles 10-90 del grupo I, en los niveles de inhibina B,

entre los niveles de prolactina e inhibina B. y, con más fuerza, con el ratio inhibina B/FSH ( $r$  0,88;  $p$  0,001;  $n$  10).

El 25,71% de los pacientes del grupo II, afectados de cáncer de próstata, en tratamiento con análogos LHRH, el 25,71% tenían el nivel de prolactina por encima del rango normal del laboratorio.

Se ha correlacionado el nivel de inhibina B con el PSA observando una correlación negativa débil ( $r = 0,21$ ). La correlación del PSA con el ratio inhibina B/FSH ha presentado un coeficiente menor ( $- 0,16$ ).

El reclutamiento de los pacientes participantes en este estudio comprendió dos posibilidades. Una de ellas que acudiesen a la consulta de Urología de forma programada y otra que estuviesen ingresados en la planta de Urología bien por urgencia urológica ó para una intervención quirúrgica.

La mayor parte de los pacientes, 79% del total, proceden de la consulta de Urología, lugar donde se atiende a la mayoría de los pacientes con procesos urológicos. En 15 pacientes (21% del total) el estudio se realizó durante ingreso, por CRU en 5, RTU próstata ó vejiga en 5, prostatectomía suprapúbica ó radical en 4 y uretrotomía endoscópica en 1.

El motivo de consulta difiere en el grupo de pacientes en tratamiento con bloqueo androgénico y el grupo control. En el primer grupo el motivo de consulta urológica fue el cáncer de próstata en todos, en el 80% de los casos, 28 pacientes, para revisión del tratamiento de bloqueo androgénico y en el resto, para tratamiento con intención curativa en 3 casos, y de complicaciones debidas al tumor en los 4 restantes.

En los pacientes del grupo control el motivo de consulta predominante fue la hiperplasia benigna de próstata y sus síntomas, tratamiento ó complicaciones en

21 pacientes, que supone el 60% del grupo. La frecuencia de este proceso en la población a partir de los 50 años y la edad de los pacientes del grupo control, apareados con los del grupo bloqueado, explican la preponderancia de la patología prostática benigna como motivo de consulta en este grupo.

El resto de los pacientes consultó por litiasis en 7 pacientes, hidrocele en 2, neoplasia vesical en 2 y epididimitis crónica y cáncer de próstata en 1 respectivamente.

Ningún paciente del grupo bloqueado ni del grupo control presentaban varicocele ni criptorquidia.

Entre los pacientes participantes en este estudio había 20, es decir, el 29%, que padecían diabetes mellitus. En el grupo bloqueado 13 pacientes, el 37%, tenían ese diagnóstico. En dos pacientes se asociaba obesidad. La obesidad aislada estaba presente en 4 pacientes de este grupo.

Entre los integrantes del grupo control la frecuencia de diabetes mellitus fue del 20%, esto es, en 7 de ellos.

De los 70 pacientes estudiados hubo 59 de ellos, el 84% del total, que padecían alguna enfermedad sistémica de importancia. En 38 pacientes, que supone el 54% del total, se detectó alguna enfermedad sistémica que potencialmente pudiera afectar la espermatogénesis ó los niveles de testosterona ó gonadotropinas.

La enfermedad más frecuente con potencial efecto lesivo gonadal en ambos grupos fue, después de la diabetes, la Hipertensión Arterial que la padecían 6 pacientes de cada grupo.

En el presente estudio, el 54% de los 70 pacientes padecía alguna enfermedad con potencial efecto de disfunción gonadal. La comparación de los niveles séricos de inhibina B, FSH, LH, Testosterona total, Prolactina, TSH, Estradiol y Ratio



Inhibina B/FSH en estos pacientes con los de aquellos pacientes sin antecedentes de enfermedades con ese potencial ha presentado una significación de 0,15; 0,95; 0,42; 0,57; 0,23; 0,48; 0,31 y 0,45 respectivamente . En el grupo II, el 51% de los 35 pacientes padecía alguna enfermedad con potencial afectación gonadal y en el grupo I era el 57% de ellos. Se ha comparado en ambos grupos, de forma separada, los niveles de las hormonas indicadas y el Ratio Inhibina B/FSH, entre pacientes afectados de esas enfermedades y en los que no existían esos antecedentes, y la significación ha sido de 0,14 para la inhibina B y superior en el resto de las determinaciones en el grupo II. En el grupo I la significación fue de 0,05 para el estradiol y 0,11 para la inhibina B, siendo superior en el resto de las determinaciones.

La exploración física de los pacientes del grupo I, incluidos el 49% de este grupo que tenía niveles séricos de testosterona total inferiores al rango normal del laboratorio, no ha mostrado signos de hipogonadismo en ninguno.

Al contrario, en los pacientes del grupo II se ha podido apreciar escaso vello torácico, axilar y facial, y tendencia al depósito de grasa en caderas y muslos. No se han detectado alteraciones del tono de la voz ó de las proporciones corporales, signos propios del hipogonadismo prepuberal.

Cuando se han correlacionado los valores de creatinina, glucosa, colesterol, proteínas totales y GOT en suero con la inhibina B el coeficiente de correlación de Pearson no ha superado en ningún caso el rango  $-0,20$  ó  $0,20$ .

Los pacientes del presente estudio se han dividido en los del grupo I, grupo control no tratado con agonistas LHRH y otro grupo II de aquellos que si seguían dicho tratamiento. El nivel sérico de testosterona total fue significativamente

inferior en los pacientes del grupo II por el efecto del tratamiento antiandrogénico por el cáncer prostático. En los pacientes del grupo I, el 48% tenían niveles de testosterona total inferiores al rango normal del laboratorio. El 57% de los pacientes del grupo I estaban diagnosticados de enfermedades y tomaban medicación que pueden afectar el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, pero su nivel de testosterona sérica no ha presentado diferencia significativa en los pacientes de este grupo que no presentaban dichos antecedentes.

Los pacientes tratados con agonista LHRH tenían la testosterona sérica por debajo del nivel de castración en todos excepto uno de los casos, que presentaba un nivel de 0,94 ng/ml. El nivel de la LH estaba por debajo de 0,14 mUI/ml en todos los pacientes, y, por consiguiente, esta gonadotropina estaba completamente suprimida en ellos.

Como han observado otros autores que ocurre en los pacientes en tratamiento con agonistas LHRH, el nivel de FSH estaba menos reducido que el de la LH en los pacientes estudiados, aunque la FSH y la LH han presentado un coeficiente de correlación positiva de 0,850 cuando se ha analizado el conjunto de los 70 pacientes. La causa de esta diferencia en la supresión de las gonadotropinas por los agonistas LHRH se ha sugerido que podría ser una inhibición de la inhibina durante el tratamiento y el consiguiente incremento de la FSH<sup>167</sup>. En el presente estudio el nivel de la inhibina B ha sido significativamente superior en el grupo de pacientes que seguían este tratamiento respecto a los pacientes que no. El nivel de la Inhibina B ha presentado una correlación con el nivel de FSH, en el grupo II de los pacientes, de un coeficiente de  $-0,13$ ;  $p 0,45$ .

En el estudio que se presenta en esta Tesis Doctoral cuando se han comparado los niveles de inhibina B en pacientes en tratamiento con acetato de ciproterona con el

nivel de aquellos tratados con antiandrógenos no esteroideos, la diferencia ha tenido una significación de 0.23. En pacientes en tratamiento con bloqueo androgénico máximo respecto a los pacientes que solamente estaban tratados con análogo de la LHRH dicha significación ha tenido un valor de 0.36.

En esta investigación hemos de tener en cuenta que la determinación de la inhibina B no es una prueba estandarizada, existe experiencia en pocos centros, y el ensayo que hemos utilizado sólo se puede efectuar para fines de investigación, no con propósitos diagnósticos ó terapéuticos. Conviene, y es un sugerencia manifestada por los autores con más experiencia en la realización del ensayo, que cada laboratorio que realice la prueba, disponga de su estándar. Para ello sería necesario llevar a cabo un volumen de determinaciones sólo disponible en centros de referencia de la misma.

Por otro lado, los resultados que hemos expuesto se deben analizar teniendo en cuenta las características del coeficiente de correlación. El valor de este coeficiente se altera de forma importante ante la presencia de valores extremos y , asimismo, este coeficiente mide sólo la relación con una línea recta. Este coeficiente no se debe extrapolar más allá del rango de valores observado, pues la relación existente puede cambiar fuera de dicho rango. También señalar que la correlación no implica causalidad, la cual requiere más información que un simple valor cuantitativo de un coeficiente de correlación.

El estudio observacional efectuado también tiene las propias limitaciones de su naturaleza. En este tipo de estudios se tiene menor control sobre los factores de confusión que en otros tipos de investigaciones, introduce sesgos, son difíciles de reproducir y costosos y caros. Por ejemplo, la variedad de la medicación utilizada

para conseguir el bloqueo androgénico, tanto oral como parenteral, puede limitar las conclusiones de los resultados obtenidos.

También se tendrá en cuenta que las definiciones de un resultado normal es distinta según el enfoque considerado. Si éste se basa en la distribución normal de Gauss, la normalidad será la media más /menos dos desviaciones estándar, lo que supone asumir que la distribución es realmente normal y que todas las anormalidades tienen la misma frecuencia de aparición. Si se emplean los valores de la distribución en percentiles normal es todo valor que se encuentre dentro del intervalo de variación del 5 al 95%, y presenta los mismos problemas metodológicos que la definición Gaussiana .

La base original de la “hipótesis de la inhibina” fue la demostración hace 65 años que un extracto testicular acuoso podría suprimir la formación de células de castración en la hipófisis anterior, sugiriendo un papel fisiológico para un producto secretor gonadal no esteroide y una actividad endocrina dual de los testículos <sup>47</sup>. Posteriormente pasaron más de 50 años antes del aislamiento y caracterización de la inhibina a mediados de los años 80 <sup>7,39</sup> . Muchas de las dificultades encontradas en el esfuerzo de aislar la inhibina surgen como resultado directo de la compleja química proteica de los miembros de la inhibina de la superfamilia de proteínas del factor de crecimiento beta transformante.

A pesar de los triunfos de la química proteica y molecular que condujeron a la caracterización de las inhibinas, numerosas dificultades metodológicas han requerido grandes esfuerzos para explorar su fisiología. Dado el alto grado de homología estructural entre diferentes miembros de la familia de la inhibina, ha sido enormemente dificultoso el desarrollo de anticuerpos específicos y de alta afinidad. El RIA pionero policlonal heterólogo generado para la inhibina bovina <sup>26</sup>

usado en los estudios iniciales de la inhibina en el humano tenía problemas de especificidad. Como el antisuero presentaba una completa especificidad epitópica para los aminoácidos 93-108 en el terminal C- de la subunidad alfa<sup>199</sup> este RIA, comúnmente llamado “ensayo Monash” es incapaz de distinguir proteínas precursoras de la alfa subunidad de inhibina dimérica biológicamente activa. Aunque este y otros ensayos de inhibina total pueden tener un papel importante como marcadores de tumores ováricos mucinosos ó de las células de la granulosa, no pueden reflejar la secreción dinámica de la inhibina dimérica. Esta limitación es particularmente relevante pues las proteínas de la subunidad alfa están presentes en abundancia en la circulación surgiendo, al menos en parte, de localizaciones extragonadales<sup>200</sup> y pueden ser reguladas de forma diferente que la inhibina dimérica<sup>201</sup>. En época relativamente reciente han ocurrido importantes avances tecnológicos con el desarrollo de un sensible y altamente específico ensayo tipo ELISA “dos zonas”, incorporando un anticuerpo específico captador tanto para la subunidad beta-A ó beta-B así como un anticuerpo de ratón detector dirigido frente a la porción N-terminal de la subunidad alfa de la inhibina de 20-kDa<sup>30,44</sup>. Aunque los primeros ensayos ELISA de este tipo se realizaron inicialmente para medir todas las inhibinas diméricas con la aparición de un estándar de inhibina B fue evidente que este ensayo era específico para la inhibina A y presentaba menos del 0,15% de reacción cruzada con la inhibina B recombinante<sup>44</sup>.

Hasta la actualidad, y debido al problema adicional encontrado en el estudio de la inhibina de que faltan preparaciones de inhibina en suficiente cantidad y pureza para administrar a humanos, muchas de las evidencias de la participación de las inhibinas en el control de las gonadotropinas en el humano se han basado en

estudios de correlación más que en manipulaciones experimentales. Además parece tener importancia la especificidad según la especie en el papel relativo de la inhibina en la retroinformación a las gonadotropinas y, así por ejemplo, las ratas tienen una considerable menor respuesta de la FSH a la administración de anticuerpos de inhibina, que los primates no humanos <sup>21</sup>. Por todos los motivos anteriores, las inferencias sobre la fisiología de la inhibina en el humano son limitadas e indirectas.

Los datos de la localización de las subunidades de la inhibina en el hombre se derivan de estudios de los testículos en el período fetal y postnatal precoz, más que en los varones adultos. Estudios inmunocitoquímicos empleando anticuerpos monoclonales purificados han demostrado la presencia de subunidades alfa y beta de la inhibina predominantemente en las células de Sertoli y, en menor extensión, en las células de Leydig de los testículos <sup>128</sup>. Consecuentemente con la ausencia de inhibina A en el suero masculino la inmunotinción frente a la beta B subunidad ha sido negativa.

La valoración de uno de los pilares básicos de la hipótesis de la inhibina, esto es, que existiría una relación inversa entre los niveles séricos de inhibina y FSH, ha sido difícil en modelos intactos puesto que la estimulación con gonadotropinas de un testículo funcional se conoce que incrementa la secreción de inhibina. De esta forma, las alteraciones en la estimulación gonadal asociadas con la pubertad normal, supresión de las gonadotropinas endógenas y administración de gonadotropinas exógenas están todas marcadas por cambios paralelos en inhibina y FSH <sup>202</sup>. Cuando inicialmente se valoró la hipótesis de la inhibina en varios modelos clínicos de hipogonadismo primario y secundario no se observó una relación recíproca entre inhibina y FSH séricas estando los niveles de inhibina

normales e incluso elevados en hombres con severas alteraciones en la espermatogénesis<sup>28</sup>. Esto provocó dudas acerca de la relevancia fisiológica de la inhibina en el hombre hasta que se reconoció que el RIA “Monash” usado en estos estudios tenía una reactividad cruzada de más del 288% con la subunidad alfa biológicamente inactiva<sup>128</sup>.

Los estudios que usaron un ensayo para medir la inhibina dimérica total, que posteriormente se apreció que tenía una mínima reactividad cruzada con la inhibina B recombinante<sup>44</sup>, mostraron que los niveles de inhibina eran virtualmente indetectables en hombres normales y con deficiencia de GnRH<sup>84,204</sup>.

Con el desarrollo de ensayos específicos para la inhibina A, Illingworth et al demostraron que en hombres normales y en aquellos con alteraciones reproductivas, las concentraciones de inhibina A eran muy bajas para tener relevancia como señal endocrina<sup>42</sup>. Posteriormente un ELISA “dos zonas” para inhibina B demostró una relación inversa entre inhibina B y FSH en un amplio rango de concentraciones de FSH en hombres normales e infértiles<sup>21,23</sup>, consistente con un potencial papel de la inhibina B como regulador, en el circuito endocrino de retroinformación, de la secreción de FSH en el varón. Asimismo, diversos autores han apreciado que la inhibina B en el suero refleja la función de las células de Sertoli<sup>31</sup>, disminuye en hombres con disfunción gonadal<sup>138</sup> y puede ser un marcador de la espermatogénesis<sup>130</sup>.

No se ha advertido correlación inversa entre inhibina B y FSH en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático<sup>132, 84</sup>.

Varios estudios han explorado la respuesta de la inhibina B a una variedad de manipulaciones hormonales en hombres normales e infértiles<sup>204, 83, 84</sup>. La inhibina B ha cambiado de forma seriada durante la inducción experimental de la

maduración sexual con GnRH exógena en hombres con deficiencia aislada de GnRH<sup>204, 84</sup>, Basalmente los niveles de inhibina B en hombres con déficit de GnRH fueron significativamente inferiores que los de los controles normales, pero se observó un sorprendente grado de variación. Aunque más de la tercera parte de los pacientes tenían un nivel igual ó inferior que el rango de trabajo del ensayo, varios tenían concentraciones dentro del rango del adulto normal. Análisis de correlación mostraron que dos factores relacionados presentaban una fuerte relación positiva con la inhibina B, el volumen testicular previo al tratamiento y una historia previa de algún grado de pubertad espontánea. Los niveles de inhibina B superiores observados en pacientes con historia de pubertad y, por lo tanto, un mayor volumen testicular, sugieren que una previa estimulación de los testículos suficiente para inducir maduración de los túbulos seminíferos tiene un impacto en la secreción de inhibina B que se mantiene después de la maduración sexual. Esta hipótesis de la existencia de un umbral durante el desarrollo para la secreción testicular de la inhibina B le apoya el patrón de inhibina B observado en niños con pubertad precoz central. En este modelo las concentraciones de inhibina B están en el rango del adulto normal en el momento de la pubertad precoz, pero durante el tratamiento con un análogo de la GnRH a una dosis suficiente para mantener las gonadotropinas indetectables, dichas concentraciones de inhibina B descienden a concentraciones similares a las detectadas en hombres con déficit de GnRH con historia de pubertad espontánea<sup>140</sup>

El estudio de hombres con un espectro de enfermedades reproductivas como hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático, síndrome de Klinefelter, oligozoospermia con niveles elevados de FSH y orquiectomizados, ha proporcionado evidencias de que la secreción de inhibina B está limitada a los testículos. Los



niveles de inhibina B fueron indetectables en hombres sin gónadas y fueron significativamente inferiores a los normales en hombres con otras enfermedades testiculares<sup>83</sup>. Este estudio también mostró la dependencia de las gonadotropinas de la secreción gonadal de inhibina B, con niveles que descendieron después de la supresión de las gonadotropinas endógenas por la administración de levonorgestrol y testosterona y se incrementaron después de la estimulación con FSH recombinante.

Se ha explorado también si las diferencias en el grado de supresión de la espermatogénesis después de la administración de testosterona exógena se podría valorar por cambios en las concentraciones de inhibina B circulante<sup>128</sup>. Durante el tratamiento con testosterona los niveles de FSH cayeron rápidamente y siguió un descenso paralelo en las concentraciones de inhibina B y seminales. Sin embargo no hubo diferencias en los niveles de inhibina B antes del tratamiento ó durante la terapia entre hombres que se quedaron azoospermicos y aquellos que no. La medida de inhibina B en el plasma no tuvo valor en predecir la respuesta espermatogénica a la administración de esteroides sexuales con propósitos contraceptivos. La observación de que los niveles de inhibina B sólo descendieron un 30% de los niveles basales a pesar de los niveles indetectables de gonadotropinas apoyan los datos anteriormente señalados que se apreciaron en hombres con deficiencia de GnRH y niños tratados de pubertad precoz. Evidencias similares se han determinado en estudios el mono, en los cuales las concentraciones de inhibina B en jóvenes fueron aproximadamente 40% superiores que en menores a pesar del hecho que el período juvenil está caracterizado por un marcado hipogonadotropismo<sup>128</sup>. Estos datos proporcionan un fuerte apoyo de un componente independiente de las gonadotropinas en la

secreción de inhibina B en el hombre que está abolido sólo en presencia de una enfermedad testicular primaria, sugiriendo que la secreción de inhibina B por las células de Sertoli puede estar regulada por interacción con las células germinales<sup>128</sup>. Otros autores también han considerado que la integridad del proceso de la espermatogénesis parece ser un segundo componente fundamental en la regulación de la inhibina por el testículo, además del efecto de la FSH<sup>133</sup>.

Se ha apreciado una significativa variación del nivel en suero de la inhibina B a lo largo del día en hombres normales. Se han detectado valores superiores a primera hora de la mañana, 09:00 horas, y un descenso progresivo hasta el nadir a las 17:00 horas. No se ha encontrado evidencia de una influencia de la FSH en esta variación diurna pero si se ha observado una relación con los niveles de testosterona y estradiol que sugiere un posible papel de estas hormonas en dicha variación, sin descartar una influencia común a todas ellas<sup>118</sup>.

Al estudiar la función de las células de Sertoli en el anciano, algunos autores han apreciado un progresivo aumento de la FSH con la edad y una fuerte correlación negativa entre la edad y la razón inhibina B/FSH. Estas alteraciones han sugerido que con la edad se ve afectado el eje hipofisario-célula de Sertoli, aunque probablemente la función global de las células de Sertoli esté mantenida<sup>162</sup>.

Se ha considerado que el descenso de este índice puede sugerir una afectación de la función de la célula de Sertoli y se ha asociado a la determinación de FSH e Inhibina B para valorar la función de la célula de Sertoli<sup>162</sup>.

Algunos autores no han observado correlación entre inhibina B y estradiol<sup>162</sup>, e incluso ha sido negativa, en el estadio III de la pubertad, y se ha considerado una correlación posiblemente accidental<sup>176</sup>, y también en adultos subfértiles<sup>204</sup>

En el caso de la LH diversos grupos <sup>138,162</sup> han observado una correlación negativa entre la LH y la inhibina B y el ratio inhibina B/FSH.

Con la TSH también se apreciado una correlación negativa en adultos subfértiles<sup>204</sup>.

Los epidemiólogos sugieren que un 30-40% de los varones mayores de 50 años tienen alguna forma de cáncer prostático, aunque sólo un 20-25% de ellos parecen tener importancia clínica <sup>180</sup>. El cáncer de próstata es muy infrecuente antes de los 50 años de edad, pero su frecuencia aumenta con una pendiente empinada a partir de ese momento, la cual se acentúa aún más a partir de los 80 años, hasta alcanzar un pico máximo ó meseta en la novena década de la vida, tanto para la incidencia como para la mortalidad<sup>181</sup>. En la década 1991-2001 se espera un aumento del 12% en la incidencia entre varones entre 75 y 84 años y un aumento del 42% en mayores de 85 años <sup>182</sup>. La longevidad se asocia, por lo tanto, a un riesgo elevado de desarrollar cáncer de próstata, siendo la edad de máxima incidencia superior a los 85 años. La edad media de los pacientes con cáncer de próstata es de 72 años con una desviación típica de 7 <sup>183</sup>.

Los pacientes diagnosticados de cáncer de próstata de este estudio participan de esta característica del tumor, afectando fundamentalmente a la población geriátrica. Todos los pacientes tienen edad igual ó superior a 50 años, el 94% supera los 60 años y el 74% los 70 años.

Aunque la mayoría de los pacientes son de edad superior a los 65 años y comparten las modificaciones fisiopatológicas del envejecimiento, se ha querido eliminar el sesgo de la edad en el estudio y se eligió un grupo control cuyas edades permitieran a sus integrantes aparearse uno a uno con los del grupo

bloqueado, siendo la diferencia de su edad limitada. De esta manera se formaron 35 parejas con diferencias de edad entre 0-11 años, promedio 4 años, DE 2.5.

Los estudios necrósicos indican que un 50% de los varones mayores de 40 años presentan signos histopatológicos de HBP, aumentando este porcentaje hasta un 90% en los mayores de 80 años <sup>184</sup>. Los síntomas de obstrucción coinciden con la instauración de HBP y así, un 25% de los varones de 55 años presenta uno ó varios síntomas de prostatismo y esta proporción aumenta hasta el 50% a los 75 años de edad <sup>185</sup>. Los pacientes pueden presentar síntomas del tracto urinario inferior ó las complicaciones de la obstrucción del mismo, a veces de gran morbilidad e incluso potencialmente letales.

Una intervención quirúrgica implica un proceso agudo en donde se suman el estado patológico basal, estrés, ayuno, ansiedad y gasto energético por la cirugía., sin detectar diferencias significativas en el mismo. Diversos autores han apreciado hipogonadismo y descenso de los niveles de gonadotropinas durante enfermedad aguda, del tipo infarto de miocardio, accidentes cerebrales, quemaduras que requirieron hospitalización, pareciendo más resistente la célula de Sertoli que la célula de Leydig a dichos procesos <sup>141</sup>. Se ha valorado el estudio hormonal realizado en los pacientes ingresados que habían sido sometidos a una intervención quirúrgica en comparación con los pacientes que no habían sido intervenidos, sin detectar diferencias significativas en el mismo entre ambos subgrupos de pacientes, incluidos los niveles de inhibina B.

Una útil definición clínica de infertilidad es la incapacidad para conseguir descendencia tras un año de relaciones sexuales sin protección anticonceptiva <sup>186</sup>.

La esterilidad se puede deber a problemas ambientales, sistémicos, gonadales, de la vía seminal, eyaculatorios, semiológicos y copulatorios. Cerca de 15% de

parejas son subfértiles, es decir, que tienen una fertilidad inferior a la normal. En cerca de la mitad de estas parejas existen factores masculinos de infertilidad. Menos de un 3% de los casos de infertilidad masculina se deben a una anomalía hormonal primaria. En presencia de una espermatogénesis normal la secreción de la hormona foliculoestimulante (FSH) es regulada a través de una inhibición negativa por la inhibina B. En los casos de una insuficiencia testicular primaria las anomalías funcionales de las células de Leydig y de Sertoli dan como resultado una elevación de los niveles de gonadotropinas con niveles normales ó reducidos de testosterona. La disfunción hipotalámica ó hipofisaria asociada con niveles insuficientes de gonadotropinas determina la presencia de niveles periféricos reducidos de testosterona y la ausencia de espermatogénesis.

En hombres infértiles con fallo testicular primario ó con fallo primario de las células germinales la Inhibina B ha sido significativamente inferior a controles fértiles<sup>137</sup>. Asimismo, hombres con hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático, infértiles con FSH elevado, enfermos con síndrome de Klinefelter y hombres orquiectomizados han mostrado unas concentraciones medias de Inhibina B sérica significativamente inferiores que en hombres normales<sup>84</sup>. En hombres con aparente fertilidad normal se ha detectado una concentración de Inhibina B superior a la de aquellos con infertilidad y espermatogénesis anormal<sup>43</sup>. En modelos de Orquitis Autoinmune Experimental la Inhibina B ha constituido un parámetro funcional de la actividad de las células de Sertoli e, indirectamente, de la germinal<sup>121</sup>, observándose un significativo descenso en los niveles de Inhibina B sérica en ratas con orquitis autoinmune.

Anawalt, expresando los valores en picogramos/mililitro, encuentra niveles de inhibina B de 37 +/- 6 en hombres infértiles con FSH elevada, 11 +/- 3 en

hombres con síndrome Klinefelter no tratados, y  $<10$  en hombres orquiectomizados, frente a  $187 \pm 28$  en hombres normales ( $p < 0.05$ ). Hombres con enfermedad primaria testicular de causas y severidad variadas, como testes no descendidos, quimioterapia previa, oligo-azoospermia y trauma testicular, con FSH elevada, tuvieron concentración media de inhibina B de  $21,08 \text{ pg./ml. (CI } \pm 95\%; 13,64-33,54)$ , observando niveles inferiores a los observados en hombres con aparente fertilidad normal<sup>31,42,83,84</sup>. Cuando se ha sometido a irradiación testicular con la consecuente afectación de la actividad espermatogénica el nivel sérico de Inhibina B ha sido indetectable<sup>119</sup>.

En adolescentes con varicocele la inhibina B no ha sido un marcador significativo de los cambios que ocurren en el testículo y del daño de la función de éste en dicho proceso<sup>139</sup>, aunque se ha observado que el tratamiento del varicocele puede incrementar los niveles de inhibina B sérica<sup>130</sup>.

También la mayor concentración de inhibina B se observa en adultos a los que se efectuó orquidopexia unilateral antes de los 2 años de edad<sup>201</sup>. El nivel de inhibina B en hombres con criptorquidia han sido inferiores que en los controles<sup>205</sup>.

La inhibina B sérica no ha superado a la FSH sérica en la predicción de la calidad de la espermatogénesis en hombres infértiles con diferentes causas de fallo espermatogénico<sup>88</sup>.

Como hemos mencionado anteriormente la edad de los pacientes participantes, determinada por la epidemiología del cáncer de próstata con relación a la misma, permite considerar a la mayoría en la edad geriátrica.

Desde el punto de vista conceptual el envejecimiento representa una dificultad progresiva para mantener la homeostasis en situaciones de sobrecarga fisiológica,

con aumento de vulnerabilidad ante cualquier tipo de agresión y pérdida de la viabilidad. Todo ello supone una reducción global de los diferentes mecanismos de reserva del organismo y un estrechamiento del margen entre las situaciones de normalidad y las de enfermedad. Importa destacar que los ancianos pueden y suelen tener enfermedades específicas de su edad, muy raras ó inexistentes en edades anteriores (p. Ej. Amiloidosis cardiaca, carcinoma prostático, incontinencia urinaria, et.); otras con una incidencia mucho más alta de la que se encuentra en periodos previos de la vida (infecciones sobre todo respiratorias y urinarias, diabetes, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardiaca, vasculopatías, etc.), facilitadas por los cambios que han ocurrido en el organismo y que además no se comportan igual que a otras edades; también las mismas enfermedades que a cualquier edad pero con peculiaridades específicas semiológicas, diagnósticas y terapéuticas; y, con mucha frecuencia compromisos de otros órganos y sistemas en el curso de enfermedades y concurrencia de más de un proceso morboso (pluripatología).

La demanda sanitaria de esta población envejecida es enorme. Los riesgos de enfermedad, incapacidad y muerte aumentan con la edad por las razones mencionadas anteriormente. La salud es la principal preocupación del anciano en nuestro país. Esto determina que la tasa de ingresos hospitalarios por encima de los 60 años doble y triplique la de la población por debajo de esa edad y sus estancias sean más prolongadas<sup>187</sup>.

Por otro lado la función hormonal y testicular normal de los testículos depende no sólo de los testículos sino también de la integridad del hipotálamo y de la hipófisis anterior, la cual forma un asa cerrada en la función del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, con una retroinformación negativa. Se ha apreciado que un gran número

de enfermedades sistémicas pueden afectar la función gonadal masculina de varias formas conduciendo a una reducción de la libido, impotencia eréctil, infertilidad, osteoporosis y descenso de la masa muscular. Los efectos de estas enfermedades sistémicas pueden ocurrir directamente a nivel testicular en las células de Leydig ó en los túbulos espermáticos y también pueden interferir con el eje hipotálamo-pituitario conduciendo a una reducción en la función testicular <sup>137</sup>.

Cualquier enfermedad del hipotálamo ó la hipófisis como un tumor hipofisario ó diversas etiologías de infiltración hipofisaria, puede ocasionar un hipogonadismo hipogonadotrópico. Además enfermedades de otras glándulas productoras de otras hormonas, como el hipertiroidismo, que puede inhibir la espermatogénesis, ó el hipotiroidismo que se ha asociado a hipogonadismo, y la enfermedad de Cushing, asociada con una reducción significativa del nivel de testosterona y gonadotropinas, pueden alterar la función gonadal masculina <sup>144,145</sup>.

Aproximadamente 50% de los hombres diabéticos padecen disfunción eréctil ó alguna alteración de la función sexual debido a una compleja interacción de factores neurovasculares, metabólicos y farmacológicos en dichos pacientes. Se ha observado en hombres diabéticos una reducción del volumen testicular y de la motilidad espermática, junto a niveles elevados de LH y FSH respecto a hombres controles <sup>146</sup>. La obesidad puede estar asociada a disminución de los niveles de testosterona total y de SHBG probablemente secundaria a hiperinsulinemia <sup>147</sup>. La observación en obesos de una disminución de la amplitud del pulso de LH sin cambios en su frecuencia, sugiere que la obesidad puede afectar a la generación de pulsos de GnRH <sup>147</sup>.

El potencial efecto en la Inhibina B de estas enfermedades se desconoce con precisión en la actualidad, pero la medición de Inhibina inmunorreactiva y



testosterona han sugerido que la función de la célula de Sertoli está menos afectada en las enfermedades agudas que la función de la célula de Leydig <sup>141</sup>.

En pacientes con HTA se han observado niveles reducidos de testosterona total y libre <sup>143</sup> y se ha sugerido una asociación inversa entre HTA y niveles de testosterona <sup>143</sup>. Junto con la anterior, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el asma, las neoplasias, la insuficiencia renal crónica, colitis ulcerosa, enfermedad de Cronh, TBC, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, cirrosis etílica y anemia falciforme conformaron el espectro de enfermedades con posible efecto en la espermatogénesis ó en los niveles de testosterona ó gonadotropinas, padecidas por los pacientes del estudio. Se ha descrito por algunos grupos, en pacientes con las mencionadas enfermedades, niveles reducidos de testosterona sérica ó disminución del recuento de los espermatozoides <sup>137</sup>.

Los niveles de inhibina B no han variado significativamente entre los pacientes con antecedentes de enfermedad que potencialmente pudiera afectar la función gonadal ó el eje hipotálamo-hipofisario-testicular, según se ha descrito en la literatura revisada, aunque con la determinación de inhibina inmunorreactiva <sup>141</sup>, no de inhibina B dimérica como en este estudio, en donde hemos observado un resultado similar.

El sistema reproductor parece especialmente vulnerable a los efectos de las drogas. Las drogas citotóxicas afectan a la fertilidad, los agentes antihipertensivos afectan a la función eréctil, algunas drogas antiulcerosas se asocian a ginecomastia, la sulfasalazina con azoospermia reversible y el alcohol con hipogonadismo entre otras. Los antidepresivos tricíclicos, las benzodiaceoinas, los antipsicóticos, antihipertensivos y varias drogas de abuso pueden afectar el

hipotálamo y la pituitaria conduciendo a un hipogonadismo hipogonadotropo ó a hiperprolactinemia. Los opiáceos pueden reducir la LH y la testosterona; los cannabinoides se pueden asociar a ginecomastia y se ha sugerido un efecto hipotalámico adicional <sup>148</sup>. Los glucocorticoides son medicamentos prescritos comúnmente y tienen un efecto potencialmente deletéreo en la función gonadal masculina, provocando hipogonadismo con alteración variable a nivel de las gonadotropinas <sup>149,150</sup>.

El sector de la población de edad superior a 65 años padece con mucha frecuencia alguna patología crónica y consume más medicación. Estudios observacionales han detectado que un 81.4% de personas de edad superior a los 65 años toma habitualmente alguna medicación, con una media de 3.1 fármacos, siendo los fármacos más consumidos los pertenecientes a los grupos cardiovascular, sistema nervioso, aparato digestivo y metabolismo <sup>126</sup>.

Por otro lado, los cambios orgánicos que ocurren como consecuencia del envejecimiento hacen que la farmacodinámica y la farmacocinética sean claramente diferentes en ese grupo etario <sup>188</sup>. Todos estos factores hacen que la posibilidad de aparición de interacciones y reacciones adversas en este grupo poblacional sea extremadamente alta.

La edad elevada de los pacientes y, por consiguiente, su alta frecuencia de patología crónica y medicación, están presentes en el estudio que presentamos. De esta manera el 86% de los pacientes del grupo bloqueado tomaban entre 1 y 5 medicamentos habitualmente, con un promedio de 2.3, y en el 31% de los pacientes de este grupo se detectó la ingesta de algún fármaco con potencial alteración a nivel del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Los fármacos con este potencial efecto fueron fundamentalmente los hipotensores y los psicofármacos.

En el grupo control estaba medicado el 80% de los integrantes del mismo, tomando habitualmente 1-5 fármacos, media 2.1. El 34% de este grupo tomaba alguna medicación con potencial efecto en el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, predominando también en esta ocasión los hipotensores y psicofármacos.

Los hipotensores tienen un efecto fundamentalmente de disfunción sexual. Además se ha sugerido una asociación inversa entre HTA y nivel de testosterona endógena <sup>143</sup> y se ha detectado unos niveles de testosterona total y libre reducidos y niveles de estradiol elevados respecto a controles, en pacientes con HTA <sup>142</sup>. Los psicofármacos pueden afectar al hipotálamo y provocar un hipogonadismo ó hiperprolactinemia <sup>148</sup>.

Cuando se instaura el hipogonadismo en un hombre adulto plenamente desarrollado, los caracteres sexuales no experimentan involución, sino que muchos de ellos se conservan, al contrario que cuando la insuficiencia testicular aparece antes de la pubertad, circunstancia en que ésta deja de desarrollarse y, por lo tanto, se conservan los rasgos sexuales infantiles, no apareciendo la maduración de la sexualidad, y los pacientes presentan signos y síntomas de eunuquismo.

Las dos terceras partes del volumen testicular corresponden al epitelio seminífero, por lo tanto una lesión testicular severa de este compartimento se traducirá en una pérdida importante de volumen testicular. Los testículos normales miden entre 3-5 cm de diámetro mayor y 2-3 cm. de anchura, teniendo valor patológico el volumen testicular total, esto es la suma de los volúmenes de ambos testículos, (VTT), inferior a 28 ml <sup>189</sup>. Existen diversos procedimientos de medir el volumen testicular. De forma aproximada con el orquidómetro de Prader <sup>190</sup>, con el

orquidómetro de Hynie <sup>191</sup> ó midiendo los diámetros principales longitudinal y transversal y aplicando la fórmula " $\pi/6 \times L \times l$  al cuadrado". Estos diámetros se pueden medir ecográficamente de forma más exacta ó con un pie de rey. Existen tablas en la literatura que relacionan el radio mayor y menor del testículo mostrando el volumen correspondiente del mismo, a partir de unas medidas determinadas <sup>192</sup>. El tratamiento con agonistas LHRH afecta al compartimento intersticial y a los túbulos seminíferos con unas severas alteraciones histológicas de los testículos. Se ha apreciado una extremada fibrosis y atrofia de los túbulos seminíferos <sup>193</sup>. En los pacientes participantes en esta investigación el VTT del grupo bloqueado ha sido significativamente inferior al del grupo control, hallazgo consecuente con las alteraciones histológicas testiculares que produce el tratamiento con agonistas LHRH.

No se ha encontrado correlación entre VTT e inhibina B en el ninguno de los grupos de pacientes. Otros autores han apreciado una fuerte correlación positiva en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico por deficiencia de GnRH idiopática <sup>84</sup>.

Con objeto de la definición de las medidas del pene para el diagnóstico de micropene se realizó un estudio en el John Hopkins en 1980 <sup>151</sup>, obteniendo un promedio usando la técnica del jalonamiento ó estiramiento de 12-14 cm en el adulto. En esta técnica se estira el pene al máximo de su longitud y se mide la distancia en línea recta desde la punta del glande al pubis. Otro método de medida es en flaccidez, obteniendo la distancia desde el glande al arranque visual del pene. La medición se puede realizar en decúbito ó de pie. Las medidas del pene de esta última forma y con el paciente de pie en una serie de 130 pacientes adultos

han mostrado unos valores entre 6 y 13 cm. Media de 8.9 cm DE 1.5 <sup>124</sup>. En los pacientes estudiados el pene se midió en flaccidez, decúbito y determinando la distancia entre la punta del glande y el arranque visual del pene.

En el hipogonadismo prepuberal el pene es pequeño, de forma cónica. El escroto es liso sin pigmento y el dartros no se contrae. En el hipogonadismo postpuberal el pene no suele disminuir de tamaño y si lo hace nunca llega a los reducidos tamaños prepuberales <sup>194</sup>.

La insuficiencia renal, la diabetes, hepatopatía e hipercolesterolemia se han relacionado con alteraciones del eje hipotálamo-hipófiso-testicular, fundamentalmente con la disminución de los niveles de testosterona e hipogonadismo hipogonadotrópico según han manifestado otros autores <sup>137</sup>.

El Estudio del Envejecimiento Masculino de Massachussets <sup>152</sup> de hombres de edades entre 39-70 años dividió a éstos en un grupo que eran obesos y tenían enfermedades médicas ó tomaban medicamentos, y otro grupo que no presentaban las anteriores características. El nivel de testosterona libre descendió 1,2%/año y la globulina ligadora de hormona sexual (SHBG) incrementó en 1,2%/año provocando una caída en el nivel de testosterona total de sólo 0,4%/año. El grupo con historia de enfermedad ó toma de medicación presentó un descenso paralelo de nivel de testosterona pero con valores de 10-15% inferiores al anterior grupo. Estudios longitudinales parecen confirmar un descenso en el nivel de testosterona relacionado con la edad <sup>153</sup>.

Se han valorado los niveles de inhibina B en el suero en el hombre anciano como un índice de la función global de las células de Sertoli y la actividad espermatogénica <sup>162</sup> habiéndose observado que los niveles de inhibina B sérica en

hombres sanos está poco afectada por la edad. Mientras los niveles medios de inhibina B sérica fueron moderadamente superiores en hombres de edad inferior a 35 años, permanecieron esencialmente sin cambios en hombres entre 35 y 79 años, apreciándose un descenso en varones de 80 años de edad y superior. En este mismo estudio se detectó, no obstante, un progresivo aumento del nivel sérico de FSH relacionado con el aumento de la edad, con descenso del ratio inhibina B/FSH, revelando que el eje hipófisis-célula de Sertoli estaba marcadamente afectado por la edad en el hombre. Mientras la función global de las células de Sertoli es mantenida en el anciano, se producen alteraciones de éstas que parece que se compensan por un adecuada respuesta de retroinformación de la hipófisis con secreción de FSH.

La administración de Gn-RH exógena y estimulación constante de los receptores hipofisarios de la misma produce inhibición de la síntesis y secreción de gonadotropinas<sup>154</sup>. Consiguientemente se inhibe la secreción y producción de testosterona por las células de Leydig testiculares y la espermatogénesis. Estos efectos ofrecen un amplio abanico de indicaciones terapéuticas, como son la pubertad precoz, endometriosis, anticoncepción y tumores de próstata ó de mama hormonosensibles. La Gn-RH se sintetizó por primera vez en fase sólida en el Laboratorio del Dr. Andrew Schally, y el producto sintético demostró tener una actividad biológica idéntica a la hormona natural<sup>155</sup>. La estructura de la Gn-RH no posee especificidad filogenética, por lo que su acción es similar tanto en el hombre como en una variedad de animales<sup>156</sup>.

Estudios practicados por Fujimo et al. Mostraron que la sustitución de la glicina-amida en posición 10 por prolina-alkilamida, prolongaba el tiempo de acción de la

Gn-RH al aumentar la resistencia a la degradación enzimática radical <sup>157,158</sup>. Otros estudios mostraron que la parte más frágil de la molécula de Gn-RH era el enlace entre la glicina en posición 6 con la leucina en posición 7 y que, cuando se realizaban sustituciones en esas posiciones, aumentaba la resistencia a la degradación enzimática <sup>159</sup>. La sustitución de la glicina en posición 6 por la D-alanina aumentaba la potencia biológica entre 350 y 400%. Cuando se sustituían al mismo tiempo los aminoácidos en la posición 6 y 10 el incremento de la actividad biológica de la Gn-RH era aún más marcado. La mayor potencia biológica se consigue cuando la glicina de la posición 6 se sustituye con radicales hidrófobos (por ejemplo el D-triptófano) <sup>160</sup>. Estas sustituciones en los aminoácidos originales de la Gn-RH ha originado un grupo de análogos sintéticos caracterizados por una vida media más prolongada y una actividad biológica superior en varios cientos de veces a la de la hormona natural.

Todos los análogos de LHRH actúan de acuerdo con los mismos principios biológicos, independientemente que sean nonapéptidos ó decapéptidos.

Los efectos a nivel del testículo incluyen una reducción rápida, después de la primera dosis, del número de receptores en la célula de Leydig, un cambio en el metabolismo esteroideo, con incremento en la secreción de los esteroides no androgénicos y C21, como la progesterona, con descenso en la secreción de esteroides androgénicos C19. La histología testicular siguiendo el tratamiento con agonistas LHRH ha mostrado una extremada fibrosis y atrofia de los túbulos seminíferos. Ocasionalmente se han visto células germinales pero muchas de las células dentro de los túbulos han sido células de Sertoli. No se han observado espermatozoides en los testículos ó epidídimos de pacientes tratados con agonistas LHRH. En los pacientes en dicho tratamiento las células de Leydig descendieron

en número y presentaron frecuentes signos de degeneración. La apariencia histológica de los hombres sometidos a este tratamiento ha sido paralela a su perfil endocrino con una aparente inactividad del compartimento intersticial y de los túbulos seminíferos <sup>136</sup>. Los vasos sanguíneos están muy dilatados y existe edema intersticial. Estos efectos comienzan entre la cuarta y séptima semana y son máximos tras cuatro meses de tratamiento. Después de interrumpirse el tratamiento, la espermatogénesis se ha recuperado gradualmente y al sexto mes la recuperación ha sido completa <sup>161</sup>.

Las posibilidades de administración de los agonistas LHRH incluye las modalidades intramuscular mensual ó trimestral (acetato de Leuprorelina ó de triptorelina) y subcutánea mensual (acetato de goserelina y de buserelina), bimensual (acetato de buserelina) ó trimestral (acetato de goserelina y de buserelina). Con las presentaciones anteriores se han publicado en la literatura resultados donde se han conseguido niveles de testosterona plasmática de castración a partir de las 2-4 semanas de la primera dosis y se mantienen mientras se continúe con el tratamiento, sin haberse observado fenómenos de escape en los niveles de testosterona después de la 2ª y 3ª dosis <sup>195,196,197,198</sup> excepto en alguna ocasión respuesta “aguda sobre crónica” sin repercusión clínica <sup>172</sup>. Tras la primera dosis de agonista LHRH se ha observado un incremento del nivel de testosterona sanguíneo durante la primera semana seguido de una supresión hasta niveles de castración <sup>163,164</sup>.

Los efectos sobre las gonadotropinas observados han sido de una elevación de las mismas durante la 1ª-2ª semana tras la primera dosis seguido de un descenso gradual de la LH y FSH hasta la 2ª-3ª semana, y de una completa y mantenida supresión del nivel de LH. La FSH también ha descendido pero en menor grado



que los niveles de LH y a veces se ha constatado un pequeño escape después de conseguir el valor mínimo de esta gonadotropina <sup>164</sup>. Con respecto al nivel plasmático de Prolactina se ha apreciado un descenso del mismo en diversos estudios <sup>166,167,168</sup>, aunque otros autores observan un incremento significativo durante el tratamiento con agonistas LHRH y han sugerido un posible valor pronóstico de este factor <sup>166</sup>.

Algunos autores han sugerido un posible valor pronóstico de la elevación del nivel de Prolactina en la progresión del adenocarcinoma de próstata en tratamiento con agonistas LHRH, <sup>169</sup>. En los pacientes estudiados no se ha observado diferencia significativa en los niveles de esta hormona entre ambos grupos. Ningún paciente tenía un nivel inferior al rango normal, pero en el 26% de los pacientes el nivel era superior al normal del laboratorio. No se ha apreciado que exista correlación entre el nivel de prolactina y el de PSA en los pacientes bloqueados.

Las observaciones del presente estudio de que, por un lado, en los pacientes en tratamiento con bloqueo androgénico por adenocarcinoma de próstata, respecto a los pacientes no tratados, el nivel de inhibina B ha sido significativamente superior y el nivel de FSH estaba significativamente reducido debido a dicho tratamiento por el adenocarcinoma de próstata; por otro lado la falta de correlación entre inhibina B y FSH en el grupo de pacientes tratados con bloqueo hormonal y, por último, el detectar que la razón inhibina B/FSH ha sido significativamente superior en los pacientes en tratamiento con bloqueo androgénico que en los controles no tratados, nos sugiere que los pacientes en dicho tratamiento tienen una mayor actividad de la célula de Sertoli que los pacientes no tratados y que el nivel de inhibina B ha sido independiente del nivel de FSH en dichos pacientes.

La causa de esta activación pudiera ser un posible efecto medicamentoso del bloqueo androgénico, que pudiera ser valorado con estudios experimentales

# **CONCLUSIONES**

- 1. Los pacientes en tratamiento con bloqueo hormonal por adenocarcinoma de próstata han presentado un nivel de inhibina B significativamente superior a los pacientes control.**
- 2. Detectamos que a mayores niveles de inhibina B, disminuyen las concentraciones séricas de TSH en los pacientes control.**
- 3. A mayores niveles de inhibina B aumentaba la concentración de estradiol en los pacientes control.**
- 4. En los pacientes control con nivel de inhibina B entre los percentiles 10 y 90 encontramos que a mayores niveles de inhibina B existían menores niveles de FSH.**
- 5. En nuestro estudio no apreciamos correlación entre la inhibina B y el resto de las hormonas analizadas en los pacientes en tratamiento con bloqueo hormonal por adenocarcinoma de próstata.**
- 6. El ratio inhibina B/FSH ha sido significativamente superior en los pacientes en tratamiento con bloqueo androgénico por adenocarcinoma de próstata respecto a los pacientes control.**
- 7. La inhibina B ha exhibido una fuerte y muy significativa correlación con el ratio inhibina B/FSH en ambos grupos de pacientes.**
- 8. En los pacientes en tratamiento con bloqueo androgénico por adenocarcinoma de próstata con niveles de inhibina B correspondientes a los percentiles 10-90 del grupo control, se ha observado que los pacientes con mayor razón inhibina B/FSH tenían niveles de prolactina más elevados.**
- 9. La correlación entre inhibina B y PSA ha sido débil en los pacientes en tratamiento con bloqueo hormonal por adenocarcinoma de próstata.**
- 10. La observación de que el nivel de inhibina B y la razón inhibina B/FSH han estado significativamente elevados en los pacientes en tratamiento con bloqueo androgénico respecto a los controles, puede significar un aumento de la actividad de la célula de Sertoli en los pacientes con ese tratamiento.**

# **BIBLIOGRAFIA**

- 1) Burger, H.G.; Igarasi, M: Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. *J Clin Endocrinol Metab*, 66:885-886. 1988.
- 2) Dye RB, Rabinovici J, Jaffe RB: Inhibin and activin in reproductive biology. *Obstet Gynecol Surv*, 47:173-85.1992.
- 3) De Paolo LV, Bicsac TA, Erickson GF, Shimasaki S, Ling N: Follistatin and activin: a potencial intrinsic regulatory system within diverse tissues. *Proc Soc Exp Biol Med*; 198:500-12. 1991.
- 4) Michel U, Farnworth P, Findlay JK: Follistatins: more than follicle-stimulating hormone suppressing proteins. *Mol Cell Endocrinol*; 91:1-11. 1993.
- 5) Carroll RS, Corrigan AZ, Gharib SD, Vale W, Chin WW. Inhibin, activin and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acid levels. *Mol Endocrinol*; 3:1969-76. 1989.
- 6) Mason AJ, Hayflick JS, Ling N, Esch F, Ueno N, Ying S-Y et al.. Complementari DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor-beta. *Nature*;318:659-63. 1985.
- 7) Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W et al.. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature*; 321:776-9. 1986.
- 8) Mason AJ, Niall HD, Seeburg PH. Structure of two human ovarian inhibins. *Biochem Biophys Res Commun*; 135:957-64. 1986.
- 9) Stewart AG, Milborrow HM, Ring JM, Crowther CE, Forage RG. Human inhibin genes: genomic characterisation and sequencing. *FEBS Lett*; 206:329-34. 1986.
- 10) Mason AJ: Functional analysis of the cysteine residues of activinA. *Mol Endocrinol*; 8:325-32. 1994.
- 11) Ling N, Ueno N, Ying S-Y et al.. Inhibins and activins. *Vitam Horm*. 44:1-46.1988.
- 12) Shimasaki S, Koga M, Esch F, Cooksey K, Mercado M, Koba A et al.. primary structure of the human follistatin precursor and its genomic organization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:4218-22. 1988.
- 13) Esch F, Shimasaki S, Mercado M , Koga M, Cooksey K, , Ling N, Ying S et al.. Structural characterization of follistatin: a novel follicle-stimulating hormone release-inhibiting polypeptide from the gonad. *Mol endocrinol*; 1:849-55. 1987.
- 14) Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FMB, Massague J, Wrana JL: Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell*, 75: 671-80. 1993.
- 15) Mathews LS, Vale WW. Expression cloning of ab activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell*; 65:973-82. 1991.

- 16) Meunier H, Rivier C, Evans RM, Vale W. Gonadal and extragonadal expression of inhibin alfa, beta A and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 247-51. 1988.
- 17) De Kretser DM, Foulds LM, Hancock m, Robertson DM. Partial characterization of inhibin, activin and follistatin in the term human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*; 79:502-7. 1994.
- 18) Halvorson LM, weis J, Bauer-Dantoin AC, Jameson JL. Dynamic regulation of pituitary follistatin messenger ribonucleic acids during the estrous cycle. *Endocrinology*; 134:1247-53. 1994.
- 19) Michel U, Albiston A, Findlay JK. Rat follistatin: gonadal and extragonadal expression and evidence for alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun*; 173: 401-7. 1990.
- 20) Cameron VA, Nishimura E, Mathews LS, Lewis KA, Sawchenko PE, Vale WW. Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary and testis. *Endocrinology*; 134:799-808. 1994.
- 21) Culler MD, Negro-Vilar A. Endogenous inhibin suppresses only basal follicle-stimulating hormone secretion but suppresses all parameters of pulsatile luteinizing hormone secretion in the diestrous female rat. *Endocrinology*; 124: 2944-53. 1989.
- 22) Carroll RS, Kowash PM, Logfren JA, Schwall RH, Chin WW. *In vivo* regulation of FSH synthesis by inhibin and activin. *Endocrinology*; 129: 3299-3304. 1991.
- 23) Findlay JK. An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod*; 48:15-23. 1993.
- 24) Demura R, Suzuki T, Tajima S, Mitsuhashi S, Odagiri E, Demura H, et al.. Human plasma free activin and inhibin levels during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*; 76:1080-2. 1993
- 25) De Kretser DM, Robertson DM: The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biol reprod*. 40:33-47. 1989.
- 26) McLachlan RI, Robertson DM, Burger HG, de Kretser DM: The radioimmunoassay of bovine and human follicular fluid and serum inhibin. *Mol Cell Endocrinol*. 46:175-185. 1986.
- 27) Baird DT, Smith KB: Inhibin and related peptides in the regulation of the reproduction. *Oxf Rev Reprod Biol* 15: 191-232. 1993.
- 28) de Kretser DM, McLachlan RI, Robertson DM, Burger HG: Serum inhibin levels in normal men and men with testicular disorders. *J Endocrinol* 120: 517-523. 1989.
- 29) Groome NP, O'Brien M, Pal R, Rodger FE, Mather JP, Mc Neilly AS: Two site immunoassays for inhibin and its subunits. Further applications of the synthetic peptide approach. *J Immunol Methods* 165: 167-176. 1993.
- 30) Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pal R, Rodger FE, Mather JP, Mc Neilly AS: Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1401-1405. 1996.
- 31) Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNeilly AS, Bremner WJ: Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and in men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3341-3345. 1996.

- 32) Robertson DM, Burger HG, Sullivan J, Cahir N, Groome N, Poncelet E, Franchimont P, Woodruff T, Mather JP: Biological and immunological characterization of inhibin forms in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 81:669-676. 1996.
- 33) Robertson DM, Cahir N, Findlay JK, Burger HG, Groome N: The biological and immunological characterization of inhibin A and B forms in human follicular fluid and plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 889-896. 1997.
- 34) Mason AJ, Farnworth PG, Sullivan J: Characterization and determination of the biological activities of non cleavable high molecular weight forms of inhibin A and activin A. *Mol Endocrinol* 10: 1055-1065. 1996.
- 35) Majumdar SS, Winters SJ, Plant TM: A study of the relative roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the regulation of testicular inhibin secretion in the Rhesus monkey (*macaca mullata*). *Endocrinology* 138: 1363-1373. 1997.
- 36) Robertson DM, Hayward S, Irby DC, et al.: Radioimmunoassay of rat serum inhibin: changes after PMSG-stimulation and gonadectomy. *Mol Cell Endocrinol* 58:1-8. 1988.
- 37) Schneyer AL, Mason AJ, Burton LE, Zeigler JR, Crowley WF: Immunoreactive inhibin alpha subunit in human serum: implications for radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol metab* 70:1208-1212. 1990.
- 38) Robertson DM, Tsonis CG, McLachlan RI, et al.: Comparison of inhibin immunological and *in vitro* biological activities in human serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 67: 438-443. 1988.
- 39) Ying SY: Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev*, 9:267-293. 1988.
- 40) Robertson DM, Sullivan J, Watson M, Cahir N: Inhibin forms in human plasma. *J Endocrinol.* 144: 261-269. 1995.
- 41) Krummen LA, Woodruff TK, DeGuzman G, et al.: Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology.* 132: 431-433. 1993.
- 42) Illingworth PJ, Groome NP, Byrd W, et al.: Inhibin B: a likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 1321-1325. 1996.
- 43) Krummen LA, Morelos BS, S. Bhasin: The role of LH in regulation of testicular inhibin alpha and beta messenger RNAs in immature and adult animals. *Endocrinology.* 127: 1097-1104. 1990.
- 44) Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M et al.: Measurement of dimeric inhibin B throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 1321-1325. 1996.
- 45) Risbridger GP, Clements J, Robertson DM, et al.: Immuno- and bioactive inhibin alpha subunit expression in rat Leydig cell cultures. *Mol Cell Endocrinol.* 66: 119-122. 1989.
- 46) Mottram JC, Cramer TV: On the general effects of exposure to radium on metabolism and tumor growth in the rat and the special effects on testis and pituitary. *Q J Exp Physiol.* 13: 209. 1923.
- 47) McCullagh GR: Dual endocrine activity of the testes. *Science.* 76:19. 1932.



- 48) Steinberger A; Steinberger E: Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured Sertoli cells. *Endocrinology*, 99:918-921. 1976.
- 49) Gonzales GF, Risbridger G, de Kretser DM: *In vivo* and *In vitro* production of inhibin by criptorchid testes from adults rats. *Endocrinology*. 124: 1661-1668. 1989.
- 50) Ishida H; Tashiro H; Watanabe M et al.: measurement of inhibin concentrations in men: study of changes after castration and comparison with androgen levels in testicular tissue, spermatic venous blood and peripheral venous blood. *J Clin Endocrinol Metab*, 72:554-9, 1990.
- 51) Yamaguchi M; Mizunuma H; Miyamoto K; et al.: immunoreactive inhibin concentrations in adult men: presence of a circadian rhythm. *J Clin Endocrinol Metab*, 72:554-9, 1991.
- 52) Vliegen MK; Schlatt S; Weinbauer GF; Bergmann M; Groome NP et al.: Localization of inhibin/activin subunits in the testis of adult nonhuman primates and men. *Cell Tissue Res*, 273: 261-8. 1993.
- 53) Kaipia A; Penttila TL; Shimasaki S et al.: Expression of inhibin beta A and beta B, follistatin and activin-A receptor messenger ribonucleic acids in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology*, 131:2703-10, 1992.
- 54) Tenover JS; McLachlan RI; Dahl KD; Burger HG et al.: Decreased serum inhibin levels in normal elderly men: evidence for a decline in Sertoli cell function with aging. *J Clin Endocrinol Metab*, 67:455-9, 1988.
- 55) McLachlan RI; Matsumoto AM; Burger HG; de Kretser DM et al.: Relative roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the control of inhibin secretion in normal men. *J Clin Invest*, 82:880-4, 1988.
- 56) Hsueh AJ; Dahl KD; Vaughan J et al.: Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:5082-6, 1987.
- 57) Kogawa K; Ogawa K; Hayashi Y et al.: Immunohistochemical localization of follistatin in rat tissues. *Endocrinol Jpn*, 38:383-91, 1991.
- 58) Spencer SJ; RaBinovici J; Mesiano S et al.: Activin and inhibin in the human adrenal gland. Regulation and differential effects in fetal and adults cells. *J Clin Invest*, 90:142-9, 1992.
- 59) Shiozaki M; Sakai R; Tabuchi M et al.: Evidence for the participation of endogenous activin A/erythroid differentiation factor in the regulation of erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:1553-6, 1992.
- 60) Yu J; Shao LE; Lemas V et al.: Importance of FSH -releasing protin and inhibin in erythrodifferentiation. *Nature*, 330: 765-7, 1987.
- 61) Rabinovici R; Goldsmith PC; Roberts VJ et al.: Localization and secretion of inhibin /activin subunits in the human and subhuman primate fetal gonads. *J Clin Endocrinol Metab*, 73:1141-9, 1991.
- 62) Vassalli A; Matzuk MM; Gardner HAR ; et al.: Activin/inhibin betaB subunit gene disruption lead to defects in eyelid development and female reproduction. *Genes Dev*, 8:414-27, 1994.

- 63) Turi T; Eramaa M; Hiden K et al.: The tissue distribution of activin betaA and betaB subunit and follistatin messenger ribonucleic acids suggests multiple sites of action for the activin-follistatin system during human development. *J Clin Endocrinol Metab*, 78:1521-4, 1994.
- 64) Wrana JL; Attisano L; Wieser R et al.: Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, 370:341-7, 1994.
- 65) Attisano L; Carcamo J; Ventura F et al.: Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell*, 75:671-80, 1993.
- 66) Mathews LS; Vale WW: Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell*, 65:973-82, 1991.
- 67) Katayama T; Conn PM: Activin modulates the intracellular signaling system activated by gonadotropin -releasing hormone: dual effecton calcium messenger system and protein kinase-C pathway. *Endocrinology*, 134:119-25, 1994.
- 68) Attisano L; Wrana JL; Cheifetz S et al.: Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell*, 68:97-108, 1992.
- 69) Shimonaka M; Inouye S; Shimasaki S et al.: Follistatin binds to both activin and inhibin through the common beta subunit. *Endocrinology*, 128:3313-5, 1991.
- 70) Carroll RS; Corrigan AZ; Gharib SD et al.: Inhibin, activin and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acids levels. *Mol Endocrinol*, 3:1969-76, 1989.
- 71) Yayon A, Klagsbrun M; Esko JD; et al.: Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*; 64:841-8,1991
- 72) Nakamura T; Sugino K; Titani K et al.: Follistatin and activin-binding protein, associates with heparin sulfate chains of proteoglycans on follicular granulosa cells. *J Biol Chem*; 266:19432-7, 1991.
- 73) Vaughan JM; Vale WW: Alfa-2 macroglobulin is a binding protein of inhibin and activin. *Endocrinology*, 132:2038-50, 1993.
- 74) Schneyer AL; O'Neil DA; Crowley WF Jr: Activin-binding proteins in human serum and follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab*; 1320-4, 1992.
- 75) Krummen LA; Woodruff TK; De Guzman G et al.: Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology*; 132:431-43, 1993.
- 76) Santoro N; Adel T; Skurnick JH: Decreased inhibin tone and increased activin A secretion characterize reproductive aging in women. *Fertil Steril*; 71(4):658-62, 1999.
- 77) Welt CK; Adams JM; Sluss PM et al.: Inhibin A and inhibin B responses to gonadotropin withdrawal depends on stage of follicle development. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(7):2163-9, 1999.
- 78) Yamoto M; Minami S; Nakano R et al.: Immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits in human ovarian follicles durin the menstrual cycle. *J Clin EndocrinolMetab*, 74:989-93, 1992.

- 79) Yamoto M; Minami S; Nakano R : Immunohistochemical localization of inhibin subunits in human corpora lutea during menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 73:470-7, 1991.
- 80) Nakatani A; Shimasaki S; DePaolo LV et al.: Cyclic changes in follistatin messenger ribonucleic acids and its protein in the rat ovary during the estrous cycle. *Endocrinology*, 129:603-11, 1991.
- 81) Li W; Yuen BH; Leung PC: Inhibition of progestin accumulation by activin-A in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 75:285-9, 1992.
- 82) Rabinovici J; Spencer SJ; Doldi N et al.: Activin-A as an intraovarian modulator: actions, localization, and regulation of the intact dimer in human ovarian cells. *J Clin Invest*; 89:1528-36, 1992.
- 83) Anawalt BD; Beb RA; Matsumoto AM et al.: Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(9): 3341-5, 1996.
- 84) Nachtigal LB; Boepple PA; Seminara SB et al.: Inhibin B secretion in males with gonadotropin-release hormone (GnRH) deficiency before and during long-term GnRH replacement: relationship to spontaneous puberty, testicular volume and prior treatment. A clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(10):3520-5, 1996.
- 85) Mahmoud AM, Goemaere S, De Backer D, Comhaire FH and Kaufman JM: Serum inhibin B levels in community-dwelling elderly men. *Clinical Endocrinology* 53:141-147. 2000.
- 86) Pierik FH; Vreeburg JTM; Stijnen T et al.: Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(9):3110-4, 1998.
- 87) Foresta C; Botella A; Rossato M et al.: Inhibin B plasma concentrations in oligozoospermic subjects before and after therapy with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*, 14(4):906-12, 1999.
- 88) Bohring C and Krause W: Serum levels of inhibin B in men with different causes of spermatogenic failure. *Andrologia*, 31(3):137-41, 1999.
- 89) Von Eckardstein S; Simoni M; Bergmann M et al.: 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(7): 2496-501, 1999.
- 90) Spratt DI; O'Dea LSL; Schoenfeld D et al.: Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH and testosterone. *Am J Physiol*, 254:E658, 1987.
- 91) Santoro N; Filicori M; Crowley WF Jr: Hypogonadotropic disorders in men and women: Diagnosis and therapy with pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev*, 7:11, 1986.
- 92) Schally AV et al.: Stimulation and inhibition of fertility through hypothalamic agents. *Drug Ther*, 1:29-32, 1971.
- 93) Labrie F et al.: LHRH and its analogues. Basic and clinical aspects. Amsterdam, Excerpta Medica, 1984.

- 94) Donnelly RJ: Clinical uses of LHRH agonists and antagonist. In: Furr BJA, Wakeling AE (eds) Pharmacology and clinical uses of inhibitors of hormone secretion and action. London, Bailliere Tindall, 1987: 432-448.
- 95) Knobil: The neuroendocrine control of the menstrual. *Recent Progress in Hormone Research*, 36:53-88, 1980.
- 96) Clayton RN and Catt KJ: Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization physiological regulation and relationship to reproductive function. *Endocrine Reviews*, 2:186-209, 1981.
- 97) Huhtaniemi IT: Testicular changes during GnRH analogue treatment. *The Releaser*, 1:9-12,1986.
- 98) Sandow J: The different mechanisms for suppression of pituitary and testicular function. *The Releaser*, 1:9-12, 1986.
- 99) Dube D, Pelletier G, Labrie F: Morphological studies of the canine pituitary luteinizing hormone (LH) cells after long-term treatment with the LH-releasing hormone (LHRH) agonist (D-Trp-6) LHRH ethylamide. *Endocrinology*, 120:589-594, 1987.
- 100) Sandow J: Pharmacology of the LHRH agonists in : Furr BJA, Wakeling AE (eds). *Pharmacology and clinical uses of inhibitors of hormone secretion and action*. London, Bailliere Tindall, 1987: 365-384.
- 101) De Jong FH et al.: Effects of long term treatment with the LH-RH analogue buserelin on the pituitary testicular axis in men with prostatic carcinoma (PCA). In: Klijn JGM, Paridaens R, Foekens JA (eds). *Hormonal manipulation: Peptides growth factors and news (anti) steroidal agents*. New-York, Raven Press, 1987:195-202.
- 102) Jacobi GH et al.: Endocrine and clinical evaluation of 107 patients with advanced prostatic carcinoma under long-term pernasal buserelin or intramuscular decapeptyl depot treatment. In: Klijn JGM, Paridaens R, Foekens JA (eds). *Hormonal manipulation: Peptides growth factors and news (anti) steroidal agents*. New-York, Raven Press, 1987:235-248.
- 103) Glode LM, Smith JaJr, The Leuprolide study group: Long-term supression of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone by daily administration of leuprolide. *J Urol*, 137:57-60, 1987.
- 104) Mathe G et al.: Phase II trial with D-Trp-6-LH-RH in prostatic carcinoma: comparison with other hormonal agents. *The Prostate*, 9:327-342, 1986.
- 105) Denis L et al.: Long term therapy with a depot LH-RH analogue (Zoladex R) in patients with advanced prostatic cancer . In : Murphy GP, Kourhy S, Küss R, Chatelain C, Denis L (eds) *Prostate cancer Part A: Research, endocrine treatment and histopathology*. New-York, AR Liss,1987:221-227.
- 106) Boccardo F: Treatment of advanced prostatic cancer with a long acting formulation of D-Trp-6-LH-RH. An Italian Prostatic Cancer Project (P.O.N.C.A.P.). In: Murphy GP, Kourhy S, Küss R, Chatelain C, Denis L (eds) *Prostate cancer Part A: Research, endocrine treatment and histopathology*. New-York, AR Liss,1987:249.

- 107) Debruyne FNJ et al.: Long term therapy with a depot LHRH analogue ("Zoladex") in patients with advanced prostatic carcinoma, *J Urol* 1987.
- 108) Faure N et al.: Preliminary results on the clinical efficacy and safety of androgen inhibition by an LH-RH agonist alone or combined with an anti-androgen in the treatment of prostatic carcinoma. *The Prostate*,4:601-972, 1983.
- 109) Kahan A et al.: Disease flare induced by induced by D-Trp-6-LH-RH analogue in patients with metastatic prostatic cancer . *The Lancet* 1984:971-972.
- 110) Prout GR, Brewer WR: Response of men with advanced prostatic carcinoma to exogenous administration of testosterone. *Cancer* , 20:1871-8, 1967.
- 111) Denis LJ, Prout GR Jr, Michielsen JP: Palliative treatment of prostatic cancer with radioactive phosphorus. *Excerpta Med Int Congress Series*, 178:22-25, 1976.
- 112) Fowler JeJr, Withmore WFJr: Considerations for the use of testosterone with systemic hemotherapy in prostatic cancer. *Cancer*, 49:1373-7, 1982.
- 113) Manni A et al.: Androgen priming and response to chemotherapy in advanced prostatic cancer. *J Urol*, 136:1242-6, 1986.
- 114) Bouffieux Ch et al.: Le traitement du cancer avancé de la prostate au moyen des analogues de la LHRH. Comment prévenir la flambée tumorale (flare-up) initiale possible? *Acta Urol Belg*, 54:304-308, 1986.
- 114) Schröder FH et al.: Log term treatment with the LHRH agonist buserelin in metastasios prostatic cancer. Two phase II studies including buserelin plus cyproterone acetate. In : Klijn JGM, Paridaens R, Foekens JA (eds). *Hormonal manipulation: Peptides growth factors and news (anti) steroidal agents*. New-York, Raven Press, 1987:225-234.
- 115) Allen JM et al.: Combined treatment wth ketoconazole and luteinizing hormone releasing hormone analogue : A novel approach to resistant progressive prostatic cancer. *Br Med J*, 287:1776, 1983.
- 116) Labrie F et al.: Complete androgen blockade for the treatment of prostate cancer. In : De Vita JrVT, Hellman S, Rosemberg SA (eds) *Important advances in oncology*. Philadelphia, JB Lippincott C°, 1985:193-205. Fujino M et al.: Syntetic analogs of luteinising hormone releasing hormone (LH-RH) substituted in positions 6 and 10. *Biochem Biophys Res Commun*, 60:406-413, 1974.
- 117) Carlsen E, Olsson C, Petersen JH, Andersson AM and Skakkebaek NE: Diurnal Rhythm in serum levels of inhibin B in normal men: relation to testicular steroids and gonadotropins. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1664-1669. 1999.
- 118) Petersen PM, Andersson AM, Rorth M, Daugaard G and Skakkebaek NE: Undetectable inhibin B serum levels in men after testicular irradiation. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 213-215, 1999.

- 119) Anderson RA: Sertoli cell function in the ageing male. *Clinical Endocrinology* 53:139-140. 2000.
- 120) Suescun M, Lustig L, Calandra RS, Groome S and Campo S: Serum inhibin B levels correlate with seminiferous tubule damage in a model of experimental autoimmune orchitis (EAO). Poster 1015. The Endocrine Society's 82<sup>nd</sup> Annual Meeting. 2000.
- 121) [www.brokes.ac.uk/inhibin/tech.html](http://www.brokes.ac.uk/inhibin/tech.html)
- 122) Randeve HS, Davison RM and Bouloux MG: *Endocrinology*. <http://www.urohealth.org/uro/ed/specialist/basic/ch09.htm>
- 123) Acuña A and Villalba C: Estudio antropométrico del pene. *Revista Urología Panamericana* 13(1) 2001. [http://www.caunet.org/revista\\_archivos/2001Vol1/4.htm](http://www.caunet.org/revista_archivos/2001Vol1/4.htm)
- 124) Daugaard G, Andersson AM, Petersen PM and Skakkebaek NE: Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis in patients treated with chemotherapy for testicular cancer. Abstract No 269. Archived Abstracts European Society for Medical Oncology. 1998. <http://www.esmo.org/reference/abstracts/gut/269.htm>
- 125) Tomás MT, Centelles F, Valero C, Alcalá A, Cerón A, Soler J and López M: Prescripción crónica de fármacos en pacientes geriátricos de un centro de salud urbano. *Atención Primaria* 23(3) 1999. [http://www.atencionprimaria.com/revista/02b\\_99](http://www.atencionprimaria.com/revista/02b_99)
- 126) Eckardstein SV, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG and Nieschlag E: 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(7): 2496-2501. 1999.
- 127) Hayes FJ, Hall JE, Boepple PA and Crowley WF Jr: Differential control of gonadotropin secretion in the human: Endocrine role of inhibin. *J Clin Endocrinol Metab* 83(6). 1835-1841. 1998.
- 128) Debeljuk L: Las taquiquininas y el eje Hipotálamo-Hipófiso. *Testicular*. SAA, 6(3). 1997. <http://www.connmed.com.ar/publicaciones/revistas/saa/3-97/3-97-04.html>
- 129) Pierik FH, Abdesselam SA, Vreeburg JT, Dohle GR, De Jong FH and Weber RF: Increased serum inhibin B levels after varicocele treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54(6):775-780. 2001.
- 130) Kinniburgh D and Anderson RA: Differential patterns of inhibin secretion in response to gonadotrophin stimulation in normal men. *Int J Androl*, 24(2):95-101. 2001.
- 131) Hipler UC, Hochheim B, Knoll B, Tittelbach J and Schreiber G: Serum inhibin B as a marker for spermatogenesis. *Arch Androl* 46(3):217-222. 2001.
- 132) Kamischke A, Simoni M, Schrameyer K, Lerchl A and Nieschlag E. *Eur J Endocrinol* 144(6):629-637. 2001.
- 133) Lee PA, Coughlin MT and Bellinger MF: Inhibin B: Comparison with indexes of fertility among formerly cryptorchid and control men. *J Clin Endocrinol Metab* 86(6):2576-84. 2001.
- 134) Schested A, Andersson AM, Muller J and Skakkebaek NE: Serum inhibina and inhibin B in central precocious puberty before and during treatment with GnRH agonists. *Horm Res* 54(2):84-91.

- 135) Rajfer J, Swerdloff RS and Heber DM: Testicular histology following gonadotropin-releasing hormone agonist treatment. *Fertil Steril* 42(5):765-771. 1984.
- 136) Turner HE and Wass JAH: Gonadal function in men with chronic illness. *Clinical Endocrinology* 47, 379-403. 1997.
- 137) Kolb BA, Stanczyk FZ and Sokol RZ: Serum inhibin B levels in males with gonadal dysfunction. *Fertil and Steril* 74(2): 234-238. 2000.
- 138) Carrillo AA, Faklis E, Glassberg K, Scaglia J, Recker B and Danon M: Relationship of serum inhibin levels to serum FSH, LH and testosterone levels in adolescents with varicocele. Abstract 378. The American Pediatric Society 107<sup>TH</sup> Annual Meeting. Society for Pediatric Research 66<sup>TH</sup> Annual Meeting. 1997.
- 139) Boepple PA, Sluss PM, Khoury R and Crowley WF Jr: Follistatin (FS) and inhibin A & B in central precocious puberty (CPP): impact of GnRH agonist (GnRHa)-induced pituitary desensitisation. Society for Pediatric Research 65<sup>TH</sup> Annual Meeting. 1996.
- 140) Dong Q, Hawker F, McWilliam D, Bangah M, Burger H and Handelsman DJ: Circulating immunoreactive inhibin and testosterone levels in men with critical illness. *Clinical Endocrinology* 36:399-404. 1992.
- 141) Hughes GS, Mathur RS and Margolius HS: Sex steroid hormones are altered in essential hypertension. *Journal of Hipertension* 7:181-187. 1988.
- 142) Khaw K and Barret-Connor E: Blood pressure and endogenous testosterone in men: an inverse relationship. . *Journal of Hipertension* 6:329-332. 1987.
- 143) Kidd GS, Glass AR and Vigersky RA: The hypothalamic-pituitary-testicular axis in thyrotoxicosis. *J of Clin Endocrin and Metab* 48:798-802. 1979.
- 144) Douglass RC and Jacobson SD: Pathologis changes in adult myxoedema: Survey oh 10 necropsies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 17:1354-1364. 1957.
- 145) Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Yue DK and Turtle R: Testicular function an d glycaemic control in diabetic men. A controlled study. *Andrologia* 17:488-496. 1985.
- 146) Vermeulen A, Kaufman JM, Delypere JP and Thomas G: Attenuated luteinizing hormone pulse amplitude but normal LH pulse frecueny, and its relation to plasma androgens in hypogonadism of obese men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76:1140-1146. 1993.
- 147) Smith CG: Drugs effects on male sexual function. *Clinical Obstetrics and Gynaecology* 25:525-531. 1982.
- 148) Baldwin DM and Sawyer CH: Effects of dexamethasone on LF release and ovulation in thr cyclic rat. *Endocrinology* 94:1397-1403. 1974.
- 149) Doerr P and Pirke KM: Cortisol-Induced suppression of plasma testosterone in normal adult males. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 43:622-629. 1976.
- 150) Lee PA, Mazur J, Danish R, Amrhein J, Blizzard RM, Money and Migeon CJ: Micropenis. I. Criteria, etiologies and classification. *John Hopkins Medical Journal* 146:156. 1980.

- 151) Gray A, Felman HA, McKinlay B and Longcope C: Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Ageing Study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 73(5):1016-1025. 1991.
- 152) Vermeulen A: Androgens in the Ageing male. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 73:221-224. 1991.
- 153) Klingmüller D, Schweikert HU: Gonadotropin releasing hormone: Physiological and endocrinological aspects. En: K Höffken, ed. *LHRH agonista in oncology*. Berlin: Springer-Verlag, 3-7. 1988.
- 154) Matsuo H, Arimura A, Nair RMG and Schally AV: Synthesis of the porcine LH and FSH releasing hormone by the solid phase method. *Biochemical Biophys Res Comm* 45:822-827. 1971.
- 155) Gomez- Pan A, Rodriguez Arnao MD, Caso Peláez E, Salvador J, García Centenera JA and Ordás Santo Tomás J: Fisiología de la hormona liberadora de gonadotrofinas y sus análogos. Revisión de sus aplicaciones clínicas. *Drugs of Today* 24:5-23. 1988.
- 156) Fujino M, Kobayashi S, Obayashi M, Shina gawa S, Fukuda T, Kitada C, Nakayaga R, Yamazaki I, White WF and Rippel RH: Structure-activity relationship in the C-terminal of luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH). *Biochemical Biophys Res Comm* 49:863-869. 1972.
- 157) Fujino M, Shinagawa S, Obayashi M, Kobayashi S, Fukuda T, Yamazaki I, Nakayaga R, White WF and Rippel RH: Further studies on the structure-activity relationship in the C-terminal part of the luteinizing hormone releasing hormone. *J Med Chem* 16:1144-1147. 1973.
- 158) Koch Y, Baram T, Hazum E and Fridkin M: Resistance to enzymatic degradation of LH-RH analogues possessing increased biological activity. *Biochemical Biophys Res Comm* 74:488-491. 1977.
- 159) Coy D, Vílchez:Martínez A, Coy E and Schally AV: Analogs of luteinizing hormone releasing hormone with increased biological activity produced by D-amino acid substitutions in position 6. *J Med Chem* 19:423-425. 1976.
- 160) Frick J and Auliyky W: Effect of a potent LH-RH agonist on the pituitary gonadal axis with and without testosterone substitution. *Urol Res* 14:261-264. 1986.
- 85) Mahmoud AM, Goemaere S, De Backer D, Comhaire FH and Kaufman JM: Serum inhibin B levels in community-dwelling elderly men. *Clinical Endocrinology* 53:141-147. 2000.
- 162) Sharifi R, Bruskewitz RC, Gittleman MC et al.: Leuprolide acetate 22,5 mg 12-week depot formulation in the treatment of patients with advanced prostate cancer. *Clin Ther* 18(4):647-657. 1996.
- 163) Dijkman GA, Fernández del Moral P, Plasman JWMH, et al.: A new longer-acting LHRH analogue depot: preliminary results of a Ducht open phase II clinical study on a 10.8 mg "Zoladex" 3-monthly depot. *Eur Urol* 18 Suppñ. 3:22-25. 1990.



- 164) Adam HK: The importance of the pharmacokinetics of hormonal drugs in the therapy of prostatic carcinoma (abstract ). *Acta Urol Ital* 6 Suppl. 2:9-17. 1992.
- 165) Parmar H, Lighthman SL, Allen L, Philips RH, Edwards Land Schally AV: Randomized controlled study of orchidectomy versus long-acting D TRP G LHRH microcapsules in advanced prostatic carcinoma. *Lancet* 2:1201-1205. 1985.
- 166) Sandow J: Inhibition of pituitary and testicular function by LHRH analogues. In Jeffcoate SL, Sandler M, eds. *Progress toward a male contraceptive* . Chichester: John Wiley and Sons; 19. 1982
- 167) Waxman JH, Wars JAH, Hendry WFM et al.: Treatment with gonadotropin release hormone analogue in advanced prostatic cancer. *Br Med J* 286:1309-1342. 1983.
- 168) Matzkin H, Kaver I, Lewyshon O, Ayalon D and Braf Z: The role of increased prolactin levels under GnRH analogue treatment in advanced prostatic carcinoma. *Cancer* 61:2187-2191. 1988.
- 169) Johnson MR, Carter G, Grint C and Lightman SL: Relationship between ovarian steroids, gonadotropin and relaxin during the menstrual cycle. *Acta Endocrinol* 129(2):121-125. 1983.
- 170) Smith CR and Norman MR: Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Ann Clin Biochem* 27:542-550. 1990.
- 171) Sharifi R, Bruskevitz RC, Gittleman MC, Graham SD Jr, Hudson PB and Stein B: Acetato de leuprorelina a dosis de 22,5 mg en formulación depot para 12 semanas en el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata avanzado. *Clinical Therapeutics. The International Journal of drug therapy. Separata en español* 18(4). Juli-agosto 1996.
- 172) Pontiroli AE y cols.; Clinical, Endocrine, Roentgenographic and Immune Characterization of hyperprolactinemic women. *Int J Fert* 32:81-85. 1987.
- 173) Dericks-Tan JSE, Siedentopf HG and Taubert HD: Discordant prolactin values obtained with different immunoassays in an infertile patient. *Lab Med* 21(9):465-470. 1997.
- 174) Surks MI, Chopra IJ, Mariás CN, Nicoloff JT and Solomon DH: American Thyroid Association Guidelines for the use of laboratory test in thyroid disorders. *JAMA* 263:1529-1532. 1990.
- 175) Andersson AM, Juun A, Petersen JH, Müller J, Groome NP and Skakkebaek E: Serum inhibin B in healthy pubertal and adolescent boys: relation to age, stage of puberty, and follicle – stimulating hormone, luteinizing hormone, testosterone and estradiol levels. *J Clin Endocrinol and Metabolism* 82(12):3976-3981. 1997.
- 176) Tyrrell CJ, Altwein JE, Klippel F, Jurincic-Winkler C, Varenshortçst E, Lunglmayr G, Boccardo F, Holdaway IM, Haefliger JM and Jordaan JP: Comparación de un análogo LHRH (acetato de goserelina) con el bloqueo androgénico combinado en el cancer de próstata avanzado: resultados finales de supervivencia de un estudio internacional multicéntrico aleatorizado. *Eur Urol*, VIII (1) 70-76. Ed Española. 2001.
- 177) Holub G, Lunglmayr G and Spona J: Effect of cyproterone/acetate (SH-714) on plasma prolactin in patients with prostatic cancer. *Urol Res* 9:245-247. 1981.
- 178) Morales A and Nickel JC: Clinical relevance or plasma testosterone and prolactin changes in advanced cancer of prostate treated with diethylstilbesterol or estramustine phosphate. *Urology* 26:477-481. 1985.

- 179) Scardino PT, Weaver R and Hudson MA: Early detection of prostate cancer. *Hum Pathol* 23:211-222. 1992.
- 180) Lew EA and Garfinkel L: Mortality at ages 75 and older in the Cancer Prevention Study (CPSI). *CA*. 40:210. 1990.
- 181) Departmente of Health. The health of elderly people. An epidemiological overview. Companion papers to volume 1. London HMSO. 1992
- 182) Arrizabalaga M, García González JI, Díez JM and cols.: Indicadores epidemiológicos del adenocarcinoma de próstata. Resultados sobre 436 pacientes. *Actas Urol Esp* 21:862. 1997.
- 183) Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC and Ewing LL: The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol* 142:474. 1984.
- 184) Arrighi H, Guess HS, Metter E and Fozard JL: Symptoms and signs of prostatismo as risk factors for prostatectomy. *Prostate* 16:253. 1990.
- 185) Chuang AT and Hiowaeds SS: Infertilidad masculina. In Logan Holtgrewe H Ed. Invitado. *Clinicas de Urología de Norteamérica. Tratamiento de los problemas urológicos en la consulta.* McGraw-Hill Interamericana Eds. SA. México. Vol 4 pg 763-774. 1998
- 186) Ribera Casado JM: Características generales el paciente geriátrico. En Resel L y Salinas J Eds.: *Clínicas Urológicas de la Complutense. Cirugía Urológica de Alto Riesgo en el Anciano.* Editorial Complutense. Vol 2:13-23. Madrid.1993.
- 187) Gil Gregorio P: Fisiología del envejecimiento y su influencia ante la cirugía. En Resel L y Salinas J Eds. : *Clínicas Urológicas de la Complutense. Cirugía Urológica de Alto Riesgo en el Anciano.* Editorial Complutense. Vol 2:25-39. Madrid.1993.
- 188) Comhaire FH: "Varicocele and male infertile", en Paulson JD, Negro-Vilar A, Lucena E y Martín L (eds.): *Andrology, Male fertility and sterility*, Academic press. 253-267. Orlando, 1986 .
- 189) Prader A: Testicular size: assessment and clinical importance. *Triangle*, 7:240-243. 1966.
- 190) Schirren C: Orquidómetro según Hynie. *Andrologie*. 4:261. 1972.
- 191) Alvarez González E: Historia y exploración del varón infértil. En Alvarez González E Ed: *Andrología: Teoría y práctica.* Ediciones Diaz de Santos SA pg 40-47. Madrid 1989.
- 192) Rajfer , Swerdloff RS and Heber DM: Testicular histology following chronic gonadotropin-releasing hormone agonista treatment. *Ferti and Steri*, 42(5): 765-771. 1984.
- 193) Rozman C and García San Miguel J: Enfermedades de las gónadas y del desarrollo sexual. En Farreras Rozman Eds.: *Medicina Interna Tomo II.* Editorial Marín SA. Pg 685-707. Barcelona 1982.
- 194) Fernández del Moral P, Dijkman GA, Debruyne FMJ, Witjes WPJ and Kolvenbag GJCM: Threemonth depot of goserelin acetate clinical efficacy and endocrine profile. *Urology*, 48:894-900. 1996.
- 195) Bouchot O, Soret JY, Jacqmin D, Lahlou N, Roger M and Blumberg J: Three month sustained release form of triptorelin in patients with advanced prostatic adenocarcinoma: results of an open pharmacodynamic and pharmacokinetic multicenter study. *Hormone Research*, 59:89-93. 1998.

- 196) Sarosdy MF, Schellhammer PF, Soloway MS, Vogelzang NJ, Crawford ED, Presti J, Chodak GW, Mitchell P and Porter L: Efectos endocrinos, eficacia y tolerabilidad de una formulación depot de 10,8 mg de acetato de goserelina administrada cada 13 semanas en pacientes con cáncer de próstata avanzado. *BJU International*, 83(7):801-806. 1999.
- 197) Tunn UW, Bargelloni U, Cosciani S, Fiaccavento G, Guazzieri S and Pagano F: Comparison of LHRH analogue 1 month depot and 3 month depot by their hormone levels and pharmacokinetic profile in patients with advanced prostate cancer. *Urol Int* 60 suppl 1:9-16. 1998.
- 198) Lambert-Messerlian GM, Steinhoff M, Zheng W et al.: Multiple immunoreactive inhibin proteins in serum from postmenopausal women with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 65:512-516. 1997
- 199) Lambert.Messerlian GM, Crowley Jr WF and Schneyer AL: Extragonadal alfa inhibin precursorproteins circulate in human male serum. *J Clin Endocrin Metab* 809:3043-3049. 1995
- 200) Wallace EM, Groome NP, Riley SC, Parker AC and Wu FW: Effects of chemotherapy induced testicular damage on inhibin, gonadotropin and testosterone secretion: a prospective and longitudinal study. *J Clin Endocrin Metab*. 82:3111-3115. 1997.
- 201) Burger HG: Inhibin. *Reprod Med Rev*. 1:1-20. 1992.
- 202) Sociedad Iberoamericana de información científica: La mayor concentración de inhibina B y el perfil más bajo de hormona foliculoestimulante se observan en adultos a los que se efectuó orquidopexia unilateral antes de los 2 años de edad. *J Urol* 162:986-989. 1999. [www.siicsalud.com/dato/dat015/00111043.htm](http://www.siicsalud.com/dato/dat015/00111043.htm)
- 203) Seminara SB, Boepple PA, Nachtigall LB et al.: Inhibin B in males with gonadotropin releasing hormone (GnRH deficiency: changes in serum concentrations after short term physiologic GnRH replacement. A clinical research center study. *J Clin Endocrin Metab*. 81:3692-3696. 1996.
- 204) Mahmoud AM; Comhaire FH and Depuydt CE: The clinical and biologic significance of serum inhibins in subfertile men. *Reprod Toxicol* 12(6):591-9. 1998.
- 205) Lee PA; Coughlin MT and Bellinger MF: Inhibin B: comparison with indexes of feretility among formerly cryptorchid and control men. *J Clin Endocrinol Metab* 86(6):2576-84. 2001.
- 206) Carballido Rodríguez JA: Cáncer de próstata hormonoindependiente. Definición y posibilidades terapéuticas. En Villavicencio Mavrich H y Resel Estévez L Eds. . Cáncer de próstata: el futuro de hoy. IDEPSA Ed. Pg 123-134. Madrid. 1996