

01689

3
2ej

**ESTUDIO DE LA PULSATILIDAD Y
BIOACTIVIDAD DE LA HORMONA
LUTEINIZANTE EN EL VARÓN
FÉRTIL E INFÉRTIL.**

T E S I S

Que para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

presenta:

ARMANDO PALACIOS ANGOLA

Asesores:

Dr. Alejandro Reyes Fuentes

Dra. María Eugenia Chavarría Olarte

Mtro. Jorge Lecumberri Flores

Sinodales:

Dr. Javier Valencia Méndez

Dra. Rosa María Páramo

Dr. Luís A. Zarco Quintero

Dra. María Eugenia Chavarría Olarte

Dr. Efraín Mercado Pichardo

Dr. Adolfo Rosado García

Dr. Alejandro Reyes Fuentes

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

273083

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Deseo reunir a todas aquellas personas e instituciones que me permitieron obtener una formación profesional y un crecimiento como ser humano, en una frase que envuelve todo mi sentimiento:

Gracias a mi Universidad, Gracias México.

Donde quiera Dios que me encuentre, ahí estarán ustedes en mi corazón.

INDICE

Resumen

Introducción, 1

Revisión de la Literatura, 5

Aspectos relacionados con la infertilidad masculina, 5

Características de la Hormona Luteinizante, 8

**Regulación neuroendocrinológica del eje
hipotálamo-hipófisis-gónada en el varón, 10**

**Mecanismos de Autorregulación del eje
hipotálamo-hipófisis-testículo, 13**

**Análisis de la pulsatilidad y bioactividad de la
hormona luteinizante, 17**

Material y métodos, 31

Resultados, 41

Cuadros, 45

Discusión, 53

Literatura citada, 63

Estudio de la pulsatilidad y bioactividad de la hormona luteinizante en el varón fértil e infértil

RESUMEN

La oligoastenozoospermia idiopática es una de las causas de infertilidad masculina más frecuente y de etiopatogenia menos conocida. A fin de obtener información sobre la participación de algunos factores endocrinos en la etiología de este tipo de enfermedad, información que no se obtiene fácilmente mediante la utilización de métodos tradicionales, se decidió aplicar algoritmos recientemente propuestos para analizar con mayor exactitud los pulsos de secreción de la hormona luteinizante (LH) y su relación con la producción de testosterona. Para ello, se tomaron muestras de suero sanguíneo, cada diez minutos durante 12 horas continuas, de 15 varones euspermicos fértiles y de 14 varones infértiles con diagnóstico clínico de oligoastenozoospermia idiopática, siendo analizados los perfiles de concentración sérica de LH así como su actividad biológica. Con la finalidad de evaluar la reserva hipofisiaria de LH, después de 8 horas de análisis de la secreción espontánea se administraron 2 pulsos intravenosos (con 2 horas de diferencia entre ellos) de un análogo de GnRH y se continuó el muestreo en la forma descrita. La pulsatilidad hormonal fue evaluada mediante análisis de grupo de datos y método de desconvolución de parámetros múltiples, así como con autoregresión lineal y series de tiempo. En los varones infértiles se encontró una disminución de la amplitud, intervalo entre pulsos y de la velocidad de secreción de los pulsos de LH bioactiva comparado con los euspermicos, sin embargo la vida media y la masa secretada por pulso de la LH fueron significativamente mayores en los infértiles que en el grupo control; de igual forma se presentó una tendencia a ser mayor la concentración media circulante de LH en el grupo de varones infértiles que en los fértiles. El incremento en la vida media y la concentración media circulante de LH en el grupo infértil sugiere la secreción de una isoforma más ácida de esta hormona en el grupo infértil. El análisis del cociente bioactividad:inmunoactividad de la LH reflejó que en todos los parámetros estudiados, la actividad biológica de la concentración circulante de LH fue mayor con respecto a la determinación inmunológica, tanto en el grupo de varones normales como en el grupo de infértiles. En el estudio de LH y su relación con la testosterona mediante análisis de series de tiempo se encontraron niveles circulantes mas altos de LH y mas bajos de testosterona en el grupo de hombres infértiles, lo cual hace posible pensar que en los infértiles se presente un proceso de producción compensatoria de LH, y como respuesta un intento de aumentar la producción de testosterona sin que se logre alcanzar la necesaria para un desempeño normal. Un hecho que no permitió encontrar diferencias sustanciales en lo que respecta a la hipótesis inicial fue que durante el desarrollo del análisis de datos hubo individuos fértiles que, a pesar de contar con los requisitos en los criterios de inclusión para el estudio, sus patrones de secreción de LH bioactiva y por ende de testosterona no se comportaron como la mayoría de los individuos en su grupo, sino que parecían más sujetos del grupo de infértiles, aún así, las diferencias observadas en el patrón de secreción de LH bioactiva en los pacientes infértiles reflejan alteraciones en el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-testículo que pueden influir en la deficiencia de la producción de espermatozoides, característica en este tipo de patología.

INTRODUCCION

Numerosos estudios han demostrado que la gametogénesis está regulada por factores neuroendocrinos (69,83). Mientras que en la mujer las fallas en la ovogénesis están vinculadas frecuentemente a trastornos en la regulación de este proceso, en la mayoría de los varones aparentemente sanos con alteraciones en la espermatogénesis no se encuentran anomalías en el funcionamiento del eje hipotálamo - hipófisis - testículo, estableciéndose el diagnóstico de infertilidad idiopática. Así pues, la oligoastenozoospermia de esta naturaleza es la causa mas frecuente de infertilidad masculina (13,15,18).

Si bien las técnicas inmunométricas (RIA, IRMA ELISA, IFMA) han permitido identificar características cuantificables de la secreción de las hormonas glucoproteicas inmunorreactivas en diferentes condiciones fisiológicas, el desarrollo de bioensayos *in vitro* de gran especificidad, sensibilidad y precisión para la medición de las concentraciones circulantes de hormonas glucoproteicas bioactivas, así como la implementación de procedimientos matemáticos para analizar y emular las características de dicha secreción hormonal, han permitido reconocer discrepancias entre los resultados de la inmunoreactividad y la bioactividad de las hormonas, así como, modificaciones en los eventos secretorios que inducen alteraciones en la respuesta fisiológica esperada (82,83,84).

La utilización del algoritmo de desconvolución de parámetros múltiples de hormonas glucoproteicas permite calcular las velocidades de eliminación endógena de las hormonas mediante un modelo en el que interactúa valores de secreción y depuración, por lo tanto es

posible obtener constantes de la velocidad de eliminación para cada individuo. Con esto se evita el error experimental que se presenta al determinar la vida media de una hormona partiendo de determinaciones de concentración simples y espaciadas en la sangre periférica. Mediante este procedimiento se puede calcular la localización temporal de cada pulso secretor, así como el intervalo entre pulsos, lo cual facilita la comparación con las características de secreción con otras hormonas en un tiempo dado. Al combinar este método con el análisis de grupo de datos (cluster analysis) se logra evaluar con eficiencia grandes cantidades de muestras obtenidas en tiempos cortos, con lo cual se aumenta el valor diagnóstico (79,118).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aún persiste cierto desconocimiento sobre muchos de los mecanismos endocrinos que regulan la fisiología reproductiva en el hombre. Con relación a esto, se puede asegurar que en la actualidad se carece de información fundamental sobre:

1. La participación de los mecanismos de regulación neuroendocrinológica del eje hipotálamo - hipófisis - testículo en los procesos de espermatocitogénesis, espermiogénesis y maduración epididimaria del espermatozoide.
2. La concertación de los eventos endocrinos, paracrinos y autocrinos que regulan la interacción fisiológica entre las células de Leydig, las células de Sertoli y las células peritubulares.

Actualmente el tratamiento y las posibilidades de pronóstico de la infertilidad masculina debida al llamado factor masculino son limitados, ya que en muchos de los pacientes que presentan alteraciones en el número, morfología, movilidad, metabolismo energético y capacidad fertilizante de los espermatozoides no se identifican consistentemente anomalías

en el eje hipotálamo - hipófisis - testículo a través del protocolo para su estudio integral (13,61), por lo que estos pacientes son identificados como de causa desconocida o idiopática.

La oligoastenozoospermia idiopática constituye una de las causas más frecuentes de infertilidad masculina. La naturaleza del defecto en el eje hipotálamo - hipófisis - testículo que incide en la etiopatogenia de dicho trastorno es desconocida. Varios trabajos han señalado la presencia de disfunción de las células de Leydig, tales como la reducción en la producción y secreción de testosterona, mientras que otros se inclinan a apoyar la teoría de que la oligozoospermia en el hombre se debe fundamentalmente a desórdenes en la mancuerna hipotálamo – hipófisis (18,24).

Se ha señalado que en este tipo de pacientes infértiles es a veces posible incrementar el número de espermatozoides en el eyaculado mediante la aplicación de gonadotrofinas. Sin embargo, el hecho de que este tratamiento produce resultados impredecibles (18,23), hace imposible relacionar directamente el aumento en la actividad biológica de las gonadotrofinas séricas con la normalización de la espermatogénesis en estos pacientes, y por lo tanto, hace dudar de una relación directa entre los niveles séricos de FSH y LH y la presencia de oligoastenozoospermia. Este hecho es confirmado por numerosos estudios en los que se ha utilizado RIA para la determinación de las concentraciones hormonales totales presentes en la sangre periférica de este tipo de pacientes, y no se ha podido identificar consistentemente diferencias significativas con respecto a las concentraciones hormonales de los varones euspermicos fértiles (13,15,61).

Sin embargo, debido a que la LH presenta microheterogeneidad (46,77,78) que puede afectar su actividad biológica, es posible que aunque los varones oligoastenozoospermicos

no presenten alteraciones en las concentraciones de LH inmunorreactivas, si tengan una secreción de LH con diferente actividad biológica a la de los varones normales, o bien patrones de secreción modificados.

Basado en lo anterior, y bajo la perspectiva de centrar la atención en la regulación neuroendocrinológica del eje hipotálamo - hipófisis - testículo, fueron analizadas las características de la secreción pulsátil de LH en varones euspermicos fértiles y varones oligoastenozoospermicos infértiles con concentraciones normales de LH inmunorreactiva, con el objeto de determinar comparativamente las características cuantitativas de la secreción espontánea e inducida de LH biológicamente activa, y determinar la relación de esta hormona con la producción de testosterona.

El presente trabajo se basó en la hipótesis general de que la pulsatilidad de la secreción de LH inmuno y bioactiva es diferente en sus características cuantitativas entre los varones euspermicos fértiles y los varones infértiles diagnosticados con oligoastenozoospermia idiopática, y puede estar asociada con una diferencia significativa en la proporción de LH bio/inmunoactiva circulante.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

ASPECTOS RELACIONADOS CON LA INFERTILIDAD MASCULINA

Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (144) han revelado que en el ser humano la frecuencia de infertilidad en la población mundial general oscila entre el 10 - 30 %. La incidencia de las patologías que afectan la salud reproductiva de la mujer y el varón varían de acuerdo a factores geográficos, ambientales y socioeconómicos (15,144). Por otra parte, el resultado de un estudio prospectivo efectuado entre 1978 y 1985 en 7,250 parejas infértiles ubicadas en hospitales de diversas regiones del mundo, empleando como instrumento de evaluación el protocolo para el estudio integral de la pareja propuesto por la O.M.S., señala que en el 45 % de estas parejas la infertilidad era atribuible al factor masculino (18). En ese sentido, se define como varón normal o euspermico fértil a todo aquel individuo aparentemente sano que haya procreado un hijo en los tres años previos a su estudio, y en el que los resultados de 2 espermatobioscopías directas realizadas con 2 semanas de diferencia y después de 3 días de abstinencia sexual, se encuentren dentro de los límites considerados como normales por la Organización Mundial de la Salud (143). Este y otros estudios de evaluación diagnóstica (11) han permitido clasificar los factores causales de la infertilidad masculina en 7 grupos: (25)

1. Factores Pretesticulares: Padecimientos del eje hipotálamo - hipófisis- testículo (pan-hipopituitarismo, síndrome de Kallman, eunuoidismo, hiperplasia adrenal congénita, tumores en sistema nervioso central) y algunas endocrinopatías (prolactinomas, síndrome de insensibilidad a los andrógenos, feminización testicular).

2. Factores Testiculares: Comprende todas las causas que modifican de manera importante la espermatogénesis: Criptorquidismo, varicocele, traumatismo testicular y algunos factores ambientales, dependientes frecuentemente de la ocupación de los sujetos, por ejemplo el calor y ruido excesivos. Se ha demostrado que la hipertermia testicular conduce a la inhibición de la espermatogénesis (53), la cual cesa completamente en el caso de criptorquidismo (70), así como en grado variable en casos de varicocele (53). Asimismo, ha sido posible relacionar algunos casos de oligozoospermia con la utilización prolongada de calzoncillos muy ajustados o de suspensorios, que mantienen a los testículos en contacto prolongado con la superficie inguinal (10), o en sujetos cuyo trabajo implica la permanencia prolongada en ambientes con altas temperaturas. Por supuesto, debe considerarse siempre dentro de estas causas la azoospermia inducida por radiación, tanto de origen accidental, como la requerida para el tratamiento de algunas enfermedades (96).
3. Factores Postesticulares: Aquí pueden incluirse los padecimientos que afectan el transporte de los espermatozoides a través de los conductos sexuales masculinos y algunos padecimientos que modifican la conducta sexual (impotencia, incompetencia eyaculatoria). Las malformaciones o padecimientos obstructivos de los conductos deferentes o glándulas accesorias pueden provocar azoospermia u oligozoospermia (hipospadias, ausencia u obstrucción de alguna porción del epidídimo, ausencia o estenosis uni- o bilateral de los conductos deferentes, y como causa especial, la vasectomía).
4. Padecimientos Infecciosos del aparato genito - urinario. Dentro de estas causas se podría incluir la orquitis como secuela de paperas pospuberales, padecimiento que conlleva a grave atrofia testicular. La existencia de enfermedades sistémicas severas acompañadas de episodios de hipertermia, produce frecuentemente un daño en la espermatogénesis,

habiéndose observado que 2-3 semanas después del periodo febril se puede diagnosticar la presencia de oligozoospermia, la cual puede prolongarse durante 2 o más meses (11,53). Las enfermedades de transmisión sexual, especialmente si han sido recurrentes y/o no han recibido tratamiento médico adecuado, producen alteraciones en los conductos epididimarios, deferentes y excretorios, así como en los constituyentes del plasma seminal, alterando la movilidad espermática.

5. Factores Generales: Síndrome de Klinefelter, síndrome de Down, anorquidismo, aplasia de células germinativas, síndrome de células de Sertoli, y las alteraciones inmunológicas, incluyendo la orquitis autoinmune, que pueden afectar la espermatogénesis, el transporte y la maduración de los espermatozoides. En esta categoría puede incluirse también estrés físico o mental, al ejercicio extenuante, la pérdida súbita de peso y el ayuno prolongado.
6. Factores Farmacológicos o Tóxicos: Se sabe que algunos medicamentos, como las sulfasalacinas (103), la cimetidina (110), la colchicina (75), los nitrofuranos (88) y los antineoplásicos (55), así como algunas drogas de uso común como la cafeína y la nicotina (87,99), el alcohol y la marihuana (55,62,95), pueden tener efectos gonadotóxicos y provocar oligo-, asteno-, o teratozoospermia. Debe mencionarse también el uso exógeno de esteroides anabólicos, que contrariamente a lo que generalmente se piensa pueden actuar como un efectivo medio anticonceptivo, deprimiendo la síntesis de gonadotrofinas e interfiriendo con el desarrollo normal de la espermatogénesis (11). Asimismo, la exposición a sustancias tóxicas en forma crónica en la niñez, adolescencia o edad adulta reduce la producción de espermatozoides al dañar el epitelio germinal.
7. Factores de Etiología Desconocida: Es frecuente localizar sujetos infértiles en los que es imposible precisar la existencia de alguna causa que justifique el padecimiento, de manera

que se incluye en la categoría de Infertilidad Idiopática, entendiéndose por ello a aquel varón que manteniendo relaciones sexuales regulares y sin protección anticonceptiva con una misma pareja fértil no haya procreado un hijo en los tres años previos al estudio y, en el que, sin patología aparente que comprometa el eje hipotálamo - hipófisis - testículo, los resultados de 2 espermatobioscopías directas, realizadas con 2 semanas de diferencia y después de 3 días de abstinencia sexual, reporten una concentración espermática menor a 20 millones por mililitro y una movilidad celular menor al 40 % (143). Son estos casos en donde las herramientas de estudio deben ser ampliadas para poder llegar a un diagnóstico, pronóstico y tratamiento adecuado.

CARACTERISTICAS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE

La LH es una hormona glicoproteica secretada en forma pulsátil por las células gonadotróficas de la hipófisis bajo influencia de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El GnRH es producido por neuronas hipotalámicas que lo depositan en la eminencia media para ser transferido a la hipófisis a través de los capilares del sistema porta hipotálamo-hipofisiario. El GnRH es secretado en forma de pulsos, cuya frecuencia puede ser modificada por factores internos y factores ambientales. Cada pulso de GnRH es seguido por un pulso de LH secretada hacia la circulación periférica. El testículo es el órgano blanco de la LH, la cual se localiza en altas concentraciones en el intersticio alrededor de las células de Leydig (16,68,139).

La hormona luteinizante estimula la producción de andrógenos, principalmente testosterona, por parte de las células de Leydig *in vivo* e *in vitro* (91). Muchos autores coinciden en el hecho de que la LH tiene muy poca influencia sobre los túbulos seminíferos

que se incluye en la categoría de Infertilidad Idiopática, entendiéndose por ello a aquel varón que manteniendo relaciones sexuales regulares y sin protección anticonceptiva con una misma pareja fértil no haya procreado un hijo en los tres años previos al estudio y, en el que, sin patología aparente que comprometa el eje hipotálamo - hipófisis - testículo, los resultados de 2 espermatobioscopías directas, realizadas con 2 semanas de diferencia y después de 3 días de abstinencia sexual, reporten una concentración espermática menor a 20 millones por mililitro y una movilidad celular menor al 40 % (143). Son estos casos en donde las herramientas de estudio deben ser ampliadas para poder llegar a un diagnóstico, pronóstico y tratamiento adecuado.

CARACTERISTICAS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE

La LH es una hormona glicoproteica secretada en forma pulsátil por las células gonadotróficas de la hipófisis bajo influencia de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El GnRH es producido por neuronas hipotalámicas que lo depositan en la eminencia media para ser transferido a la hipófisis a través de los capilares del sistema porta hipotálamo-hipofisiario. El GnRH es secretado en forma de pulsos, cuya frecuencia puede ser modificada por factores internos y factores ambientales. Cada pulso de GnRH es seguido por un pulso de LH secretada hacia la circulación periférica. El testículo es el órgano blanco de la LH, la cual se localiza en altas concentraciones en el intersticio alrededor de las células de Leydig (16,68,139).

La hormona luteinizante estimula la producción de andrógenos, principalmente testosterona, por parte de las células de Leydig *in vivo* e *in vitro* (91). Muchos autores coinciden en el hecho de que la LH tiene muy poca influencia sobre los túbulos seminíferos

aislados en forma experimental (2,8,9,70,91), sin embargo, la testosterona producida por influencia de la LH sí afecta la función de las células de Sertoli y las células germinativas, por lo que la LH tiene efectos indirectos sobre estas células (41,83,113). En las células de Leydig existen receptores que se unen tanto a la LH como a la gonadotropina coriónica humana hCG (72,83,90). Esta población de receptores se reduce después de la hipofisectomía (91), o después de un tratamiento con hCG (90). Aunque esta autorregulación negativa de receptores puede ser debida a una disminución en la respuesta de las células de Leydig aisladas *in vitro*, esto es siempre precedido por un incremento en el número de receptores, y su significancia *in vivo* aún permanece incierta, particularmente por el hecho de que se necesitan altas dosis de hCG para producir dicho efecto (49,89). También debe señalarse que el tratamiento de ratas enteras con pequeñas dosis repetidas de hCG incrementa la respuesta testicular *in vivo* a pesar de la pérdida de receptores (92).

La bioactividad de la LH varía en forma sustancial al presentarse eventos fisiológicos y patológicos diversos, tanto en humanos como en animales. En un hombre normal, el contenido de LH biológicamente activa en la sangre se incrementa de manera significativa al comenzar el proceso de la pubertad (34,139). Es posible modificar el patrón de bioactividad de la LH mediante la administración de diversos tratamientos. Así, la aplicación de 5- α dihidrotestosterona en hombres normales provoca una reducción en los niveles de LH bioactiva circulante (31), mientras que la administración de bloqueadores para los receptores de testosterona resulta en un aumento en los niveles de inmunoreactividad y bioactividad de la LH en varones jóvenes (106). Este último incremento se presenta acompañado por un incremento en la cantidad total de LH secretada, sin detectarse variaciones en la duración de los pulsos de LH, evidenciando con esto que existe en el

00010

mensaje regulatorio, no solo el componente de la frecuencia de la señal, sino también la cantidad de hormona biológicamente activa que se secreta. A pesar de que se conoce que los andrógenos y estrógenos modifican la cantidad, calidad y actividad biológica de la LH circulante, todavía existen dudas acerca de la influencia directa del hipotálamo, la hipófisis, o ambos, en la fisiología normal de la regulación de las hormonas esteroideas sexuales en el hombre (83).

REGULACION NEUROENDOCRINOLOGICA DEL EJE HIPOTALAMO- HIPOFISIS-GONADA EN EL VARON

La dependencia hormonal de la espermatogénesis está bien establecida, sin embargo, todavía persiste cierto desconocimiento acerca de los mecanismos endocrinos fundamentales que regulan la actividad reproductora en el hombre, incluyendo los mecanismos que regulan la función del eje hipotálamo - hipófisis - testículo, y la interacción entre las células de Leydig, Sertoli y peritubulares.

La espermatogénesis involucra una compleja secuencia de eventos intratesticulares, estrechamente concatenados, desde la división celular y diferenciación de las espermatogonias, hasta la producción en número suficiente de espermatozoides estructural y funcionalmente íntegros (4,8,12,43,114,135), modulados todos ellos por las hormonas luteinizante (LH) y foliculo estimulante (FSH).

La FSH ejerce su función a través de las células de Sertoli, regulando la maduración de las células germinativas en sus diferentes etapas. La LH participa también de manera importante en la espermatogénesis, debido a que promueve la existencia de un

microambiente intracelular donde prevalece una concentración elevada de testosterona necesaria para el funcionamiento normal del espacio espermatogénico (12,16,114,135).

La participación de la LH es esencial para la secreción de testosterona, cuya síntesis es inducida *in vivo* minutos después que la LH interacciona con sus receptores en la membrana plasmática de la célula de Leydig (9,12,31,90,91,92).

Las hormonas glucoproteicas LH y FSH están constituidas por subunidades moleculares diferentes. Ambas gonadotrofinas están integradas por una subunidad α idéntica y una subunidad β diferente para cada hormona y que las distingue entre sí. En este contexto, la estructura polipeptídica de la subunidad β difiere tanto entre las hormonas LH y FSH así como con otras hormonas glucoproteicas, tales como la tirotrófica (TSH) y la gonadotrofina coriónica humana (hCG). Los genes para las subunidades β de LH y FSH son codificados en distintos cromosomas y por lo tanto sometidos a una regulación diferente. Un sitio crítico en la regulación de los genes de las gonadotrofinas está en la transcripción inicial, la cual puede ser modificada por GnRH y por las hormonas esteroides. Desde luego, la transcripción de las subunidades α y β de las hormonas gonadotróficas es sensible a la frecuencia y a la amplitud de los pulsos de GnRH que llegan a la hipófisis anterior (3,16,17,19,21,56,67,71,73,94,135). Estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado la necesidad de una frecuencia y una amplitud óptimas en los pulsos de GnRH para activar la transcripción genética de las subunidades α y β de LH y FSH, y con menor exigencia para la transcripción del gen α de LH (17,21,47,60,67,71,94). Por ejemplo, en la rata, un pulso de GnRH emitido aproximadamente cada 30-45 minutos parece ser suficiente para la activación del gen que transcribe la subunidad β de LH, con el

consiguiente aumento en las células gonadotróficas de la concentración de RNA mensajero específico para esa subunidad. En contraste, el gen que codifica para la subunidad β de FSH es activado mas eficientemente por un pulso de GnRH emitido cada 90-120 minutos. Por otra parte, un amplio rango de frecuencias en los pulsos de GnRH, o inclusive una liberación continua de esta hormona, estimulan la transcripción del gen que codifica para la subunidad α (21,60,94). Existe también una dependencia significativa de la síntesis de gonadotropinas asociada con la amplitud de los pulsos de GnRH (74).

Después de la acumulación de las cantidades adecuadas específicas de RNA mensajero que codifican para las subunidades β de LH y FSH, así como para la subunidad α común, la síntesis de las hormonas polipeptídicas se lleva a cabo en los ribosomas. La estructura polipeptídica resultante es transportada al aparato de Golgi dentro de la célula, donde suceden las modificaciones postraduccion, que consisten en la glicosilación específica de esta estructura, o bien la adición de ácido siálico a las subunidades proteicas α y β , y/o la sulfatación en el caso de la subunidad β de la LH (31,58,90,92). Las hormonas gonadotróficas maduras así modificadas manifiestan diferencias en su carga eléctrica y sus pesos moleculares. Tal heterogeneidad en las formas moleculares de LH y FSH influye en la velocidad de su depuración metabólica, en la unión con el tejido específico y en la potencia de activación de las gonadotropinas secretadas (31).

En un medio ambiente empobrecido de esteroides que prevalece en los casos de castración, o en la falla ovárica funcional (por ejemplo en la menopausia), las isoformas ácidas de LH y FSH tienden a predominar en la hipófisis anterior, el plasma sanguíneo y en la orina. Estas isoformas ácidas tiene una actividad biológica relativamente baja *in vitro*, en los

bioensayos con células de Leydig (LH), así como en los que utilizan las células de la granulosa y de Sertoli (FSH), pero generalmente presentan una depuración metabólica baja, con una consecuente vida media larga, logrando así aumentar su actividad biológica *in vivo*. Por el contrario, en un ambiente pleno en esteroides, como el que prevalece en las mujeres jóvenes durante la fase folicular media del ciclo menstrual, existe un predominio de las isoformas básicas de LH y FSH en la sangre periférica (22,26,27,31,65). Estas isoformas básicas son potentes estimuladores de las células gonadales *in vitro*, sin embargo *in vivo* experimentan una depuración metabólica relativamente rápida y por lo tanto una vida media corta, por lo que son accesibles por poco tiempo a los sitios receptores correspondientes.

Después de la estimulación fisiológica con GnRH es perceptible un aumento en la actividad biológica de LH en la sangre periférica en el varón sano (32,92,126,127), situación que sugiere una secreción rápida de LH biológicamente activa como respuesta a la acción de GnRH. Estas consideraciones permiten señalar la precisión y complejidad del control que ejercen las células gonadotróficas sobre las propiedades bioquímicas de las hormonas secretadas, con los efectos subsecuentes *in vivo*, tanto en la depuración metabólica de las hormonas, como en la actividad biológica tisular de las isoformas secretadas (31,58).

MECANISMOS DE AUTORREGULACION DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-TESTICULO

Las células gonadotróficas de la hipófisis anterior responden al GnRH secretando LH y/o FSH para estimular la androgénesis o la espermatogénesis (83,91). Todo producto intermedio o final de esta cascada retroalimentará a varios niveles en el eje reproductivo para regular así la producción hormonal. Así pues, si hay una retroalimentación deficiente aparece a nivel hipotalámico se presentará una alteración en la frecuencia de los pulsos de GnRH, mientras que si la alteración en la retroalimentación se da a nivel hipofisiario, no se afecta la frecuencia de secreción de las hormonas gonadotróficas, pero sí la magnitud de la respuesta de éstas a cada pulso de GnRH. La influencia directa de los diferentes mecanismos de regulación del sistema reproductivo masculino hasta ahora no ha sido bien dilucidada, sin embargo, es bien sabido que la testosterona y sus derivados, así como la inhibina están regulados mayormente por el eje hipotálamo - hipófisis (41,83,91).

El GnRH sintético estimula la secreción tanto de LH como de FSH *in vivo*, así como en células hipofisiarias *in vitro*, por lo que este sencillo decapeptido (pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Leu-Iso-Arg-Pro-Gly NH₂) es el iniciador de la cascada reproductiva (73). Esta conclusión se basa en el hecho de que con la administración de GnRH se restaura la actividad gonadal en animales de laboratorio con lesiones hipotalámicas (91). En el hombre, se ha usado la administración de GnRH para restaurar la secreción de LH y FSH en pacientes con deficiencias de GnRH por síndrome de Kallman, síndrome de Rudd, de Laurence-Moon-Bield, y otras formas de enfermedades hipotalámicas, como por ejemplo la anorexia nerviosa (25). El GnRH también restaura la secreción de

gonadotrofinas después de la destrucción de hipotálamo o del tallo hipofisiario debido a la irradiación (3,7,43). Tanto en animales como en el hombre la inmunización activa contra el GnRH provoca un descenso en los niveles circulantes de gonadotrofinas (86). Este efecto también se produce después de la administración de antisuero contra GnRH (37) y después del tratamiento con antagonistas y superagonistas del GnRH (20,56). A pesar de estos estudios, se mantiene constante el debate acerca de si el GnRH es el principal o el único estimulador en la producción de FSH (83).

No es posible determinar las concentraciones de GnRH en la circulación periférica debido a la gran dilución de las pequeñísimas cantidades de la hormona (20-800 pmol), que se secretan hacia el sistema porta hipotálamo- hipófisis, así como a la rápida degradación de la hormona en la circulación (17). Asimismo, algunos tejidos producen péptidos idénticos o muy similares al GnRH, los que podrían provocar confusiones al medir los niveles de GnRH en la circulación periférica (60). Debido a que las concentraciones periféricas de GnRH no tienen ninguna relación con su liberación a nivel hipotalámico, por lo expresado anteriormente, la cuantificación del GnRH se hace impráctica y de dudosa utilidad. Existen métodos indirectos para estudiar el modo de secreción del GnRH. Estos incluyen modelos *in vitro* utilizando glándulas o cultivos hipofisarios para probar la respuesta a diferentes dosis de infusión de GnRH; respuestas *in vivo* de animales lesionados a nivel hipotalámico ante diferentes dosis de GnRH, y monitoreo de los patrones de secreción de LH como reflejo de la actividad hipotalámica. El mecanismo por el cual el GnRH estimula la liberación de gonadotrofinas se puede dividir en tres pasos. El primero, es una unión reversible y de alta afinidad ($K_d 10^{-9}$ mol/l) entre el GnRH y sus receptores en la membrana plasmática de las células

gonadotrofas; segundo, la microagregación de receptores; y tercero, la movilización de calcio (19). Todo esto resulta en la preparación de las células hipofisarias para la producción y secreción de hormonas gonadotróficas. El GnRH autoregula a sus propios receptores. Las concentraciones fisiológicas normales de GnRH tienen un efecto de autorregulación positiva que aumenta la sensibilidad de la hipófisis al GnRH, de tal forma que aumenta la amplitud de la respuesta a cada pulso de GnRH. En contraste, la presencia continua de altas concentraciones de GnRH provoca una autorregulación negativa de los receptores de GnRH en las células gonadotróficas. Ahora bien, esta desensibilización debida a exceso de GnRH, no es producida solamente por la autorregulación negativa de los receptores, sino también por la disminución de la cantidad de gonadotropinas y a la presencia de un periodo refractario en los eventos pos-receptor (41,83).

Al realizar estudios de identificación directa de la presencia de hormonas gonadotróficas en las células hipofisarias se ha demostrado que el 70% de los gonadótropos contienen tanto LH como FSH, un 17 % sólo contiene LH y un 13 % sólo FSH (26). En células hipofisarias mantenidas en cultivo se encontró que el 57 % contenían tanto LH como FSH, y este porcentaje aumentó a 74% después de la administración de GnRH durante 4 horas (27). Esto explica parcialmente las diferencias en la secreción de FSH y LH en determinado momento, aunque el mecanismo que regula dicha actividad no ha sido esclarecido.

La LH y la FSH se acoplan a receptores específicos en el testículo para regular las funciones de las células de Leydig y túbulos seminíferos. Aunque existe una compleja interrelación entre ambas hormonas gonadotróficas y las mencionadas estructuras

testiculares (12), la LH estimula principalmente la síntesis y secreción de testosterona por parte de las células de Leydig, mientras que la FSH regula la espermatogénesis.

Al unirse la LH a las células de Leydig se estimula la producción de testosterona y en menor medida estradiol y otros productos. La mayor parte del estradiol circulante en el macho proviene de la conversión periférica de testosterona (43). La FSH potencializa los efectos de la LH sobre la producción de testosterona, probablemente incrementando el número de receptores para LH en las células de Leydig. Esta relación es similar a la observada también en las células de la teca interna del ovario (41).

La FSH se une a receptores de membrana de las células de Sertoli en el túbulo seminífero y estimula la espermatogénesis. Este efecto es complementado por la estimulación provocada por la testosterona, la cual difunde hacia el túbulo seminífero desde las células de Leydig (43).

ANÁLISIS DE LA PULSATILIDAD Y BIOACTIVIDAD DE LA HORMONA LUTEINIZANTE

En estudios realizados tanto en el humano como en otras especies de mamífero desde hace más de 20 años, se ha demostrado que las glándulas endocrinas modulan la actividad de las células blanco a través de un patrón de secreción hormonal de naturaleza pulsátil, más que mediante una secreción continua (39,42,111,128). La importancia fisiológica de que las señales hormonales sean intermitentes, radica en que con esto se evita la desensibilización de los tejidos blanco que ocurre en presencia de concentraciones hormonales sostenidas y sin variación (127). Además, la secreción pulsátil favorece la autorregulación de los receptores, ya sea positiva o negativa (57). No obstante, la cinética de estos eventos secretorios endocrinos es particularmente difícil de elucidar *in vivo* debido a la compleja

testiculares (12), la LH estimula principalmente la síntesis y secreción de testosterona por parte de las células de Leydig, mientras que la FSH regula la espermatogénesis.

Al unirse la LH a las células de Leydig se estimula la producción de testosterona y en menor medida estradiol y otros productos. La mayor parte del estradiol circulante en el macho proviene de la conversión periférica de testosterona (43). La FSH potencializa los efectos de la LH sobre la producción de testosterona, probablemente incrementando el número de receptores para LH en las células de Leydig. Esta relación es similar a la observada también en las células de la teca interna del ovario (41).

La FSH se une a receptores de membrana de las células de Sertoli en el túbulo seminífero y estimula la espermatogénesis. Este efecto es complementado por la estimulación provocada por la testosterona, la cual difunde hacia el túbulo seminífero desde las células de Leydig (43).

ANALISIS DE LA PULSATILIDAD Y BIOACTIVIDAD DE LA HORMONA LUTEINIZANTE

En estudios realizados tanto en el humano como en otras especies de mamífero desde hace más de 20 años, se ha demostrado que las glándulas endocrinas modulan la actividad de las células blanco a través de un patrón de secreción hormonal de naturaleza pulsátil, más que mediante una secreción continua (39,42,111,128). La importancia fisiológica de que las señales hormonales sean intermitentes, radica en que con esto se evita la desensibilización de los tejidos blanco que ocurre en presencia de concentraciones hormonales sostenidas y sin variación (127). Además, la secreción pulsátil favorece la autorregulación de los receptores, ya sea positiva o negativa (57). No obstante, la cinética de estos eventos secretorios endocrinos es particularmente difícil de elucidar *in vivo* debido a la compleja

influencia de la eliminación metabólica de las hormonas (104,126,127). Además, las mediciones *in vivo* de la actividad biológica de la LH no tiene hasta ahora un valor predictivo confiable debido a la falta de una técnica adecuada (38).

Aunque los ensayos *in vitro* para medir la bioactividad de la LH no siempre reflejan la situación *in vivo*, existen buenas evidencias de que tal estimación está relacionada con la producción de testosterona *in vivo* (77). Los estudios *in vitro* de la LH, mediante el uso de técnicas inmunológicas son muy sensibles y muy específicos, sin embargo no permiten medir la hormona con suficiente exactitud debido a los factores que influyen en el valor resultante de la medición, como puede ser la tasa de eliminación metabólica de la hormona (38), o alguna modificación en las características de la molécula. Por ejemplo, Haavisto et al. (46) en 1995 describieron una variante de LH que no es detectada por inmunoensayos que utilizan anticuerpos monoclonales, por lo que presenta una inmunorreactividad aberrante. Esta forma variante de LH es causada por la mutación de dos codones en el gen que codifica a la subunidad beta de la LH. Uno de ellos introduce una señal extra de glicosilación a la cadena de la subunidad beta (37,46,86).

Las hormonas hipofisarias LH y FSH, así como la hCG, son glicoproteínas heterodiméricas, las cuales contienen dos diferentes subunidades, la alfa y la beta. La secuencia peptídica de la subunidad alfa es común para todas ellas, en cambio, la subunidad beta difiere en cada hormona y confiere especificidad inmunológica y biológica (77,90,100). Además, existen varias formas moleculares de LH (isoformas), por lo que la LH presente en la hipófisis, o aquella presente en la sangre o en la orina, está conformada por proporciones variables de cada isoforma. Estas isoformas tienen diferentes puntos

isoelectrónicos, tamaño y peso molecular, contenido de carbohidratos y secuencia terminal de las subunidades alfa y beta. Todas estas diferencias se han reflejado en variaciones frecuentes en los estudios de bioactividad *in vivo* e *in vitro*, y sobre todo han dificultado el establecer correlaciones con resultados provenientes de estudios inmunológicos.

Se piensa que la hipófisis es capaz de regular no solo la cantidad de LH a secretar, sino también la actividad biológica, al variar la microheterogeneidad de las moléculas (77,90,100). Actualmente no se conoce a cabalidad la base estructural de esta microheterogeneidad, sin embargo, se puede inferir que ciertas isoformas de LH estimulan más eficientemente la secreción de testosterona (77,97).

Al utilizar dos diferentes métodos de análisis inmunométrico (IRMA e IFMA) ante el estudio de una misma muestra de LH, pueden presentarse resultados solamente parecidos, lo que hace pensar que las subunidades beta confieren heterogeneidad a la LH, la cual juega algún papel en la antigenicidad ante el inmunoensayo (45,46,86).

Por otra parte, la caracterización de la secreción pulsátil de cualquier hormona requiere de la obtención repetida de muestras de sangre periférica de los individuos en estudio, a intervalos cortos y durante un periodo relativamente largo (120,123). En estas muestras se cuantifican las hormonas de interés mediante análisis inmunoradiométricos (IRMA), análisis radioinmune (RIA) y/o bioensayos, y los datos resultantes se identifican como series de tiempo de las concentraciones hormonales (44,78,124)

A pesar del avance conceptual y metodológico de la endocrinología, la cinética pulsátil de los eventos secretorios es difícil de evaluar adecuadamente *in vivo* debido a la compleja

influencia de procesos simultáneos, incluyendo las diferentes velocidades de secreción, su inactivación, la fijación a otras moléculas, el recambio de los sitios de fijación, la eliminación dinámica de las hormonas, etc. Las concentraciones séricas de LH medidas simultáneamente por RIA y por bioensayos, frecuentemente difieren. Uno de estos hallazgos ha sido la disminución de la tasa de actividad biológica/actividad inmunológica de la LH durante la producción de cada pulso secretorio. Esta variación ha sido atribuida a diferencias en la proporción de las distintas isoformas de LH secretadas en diferentes momentos (14,83,126).

No obstante que las concentraciones hormonales medidas por RIA en el suero de individuos normales en muchas ocasiones no presentan cambios con relación a aquellas muestras de individuos con fallas en la espermatogénesis (13,15,18), los recursos analíticos con que cuentan actualmente los estudios endocrinológicos permiten la identificación de factores no detectados por los resultados directos que presenta el análisis. Aunque está confirmado por numerosos estudios realizados por RIA, que las concentraciones hormonales totales en sangre periférica de individuos con oligoastenozoospermia idiopática no difieren significativamente de las concentraciones hormonales de varones euspermicos fértiles, se debe tener en cuenta la concentración hormonal determinada por RIA no siempre tiene relación con la actividad biológica evaluada mediante bioensayos específicos (13,15,61,104,126,127).

Existen varios problemas adicionales para la medición de la LH, por ejemplo, la sensibilidad del radioinmunoensayo para la medición de LH en sangre periférica de ratas frecuentemente es insuficiente: los niveles circulantes normales de LH están en los límites

de sensibilidad de estos ensayos, y si los niveles están suprimidos, los cambios pueden no ser detectados. La sensibilidad típica en los ensayos de LH es de 0.2-0.3 ng/ml, los cuales se llegan a encontrar en ratas hipofisectomizadas (45). Esto hace pensar que, además de la variación propia del ensayo, se pueden presentar modificaciones en los parámetros a establecer en el momento de medir la hormona en las diferentes especies animales. Ante esta situación se ha hecho necesario utilizar otras técnicas de medición hormonal, como por ejemplo el estudio de la bioactividad de la LH, con el fin de obtener una tasa que estime más eficientemente los valores bajos de la LH.

Normalmente los valores de la LH bioactiva son superiores a los valores de la LH inmunorreactiva en las mujeres normales, sobre todo durante la fase folicular, no obstante, durante la fase lútea esta diferencia no se puede apreciar aunque, se puede definir que la concordancia de la pulsatilidad de la LH bioactiva e inmunorreactiva es irregular (38).

El bioensayo para la producción de testosterona por parte de células intersticiales de testículo de rata macho (RICT) tiene una adecuada sensibilidad y precisión que lo hace útil para la medición de esta bioactividad en el suero de hombres normales y mujeres no gestantes. Los valores de LH bioactiva medidos mediante RICT en varones normales están altamente asociados con aquellos valores de LH obtenidos por radioinmunoanálisis, aunque por lo general, los valores absolutos de LH bioactiva son mayores que los de LH inmunorreactiva (28,32,49)

La técnica del RICT se basa en la producción de testosterona por parte de células intersticiales de rata macho adulta al ser expuestas, por un lado, a la LH del suero de la muestra en estudio, y por otro lado, a la LH estandarizada, según la preparación de

referencia internacional de hormona luteinizante que produce y distribuye el National Pituitary Program perteneciente al Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (28,100). Con los valores obtenidos al realizar el ensayo con diferentes concentraciones de las hormonas estandarizadas se construye una curva estándar, contra la cual se comparan los valores obtenidos al analizar la muestra problema (9,28,32,33,34,49).

La frecuente observación en la detección de los pulsos, permite obtener intervalos de confianza altos para todas aquellas amplitudes consideradas como simultáneas. Estudios recientes demuestran que bajo estas condiciones, la obtención de muestras sanguíneas cada 10 minutos resulta en una sensibilidad y especificidad por encima del 90% para la detección de los pulsos secretorios de LH, pudiéndose estimar valores confiables de vida media y tasa de producción de la hormona (134).

La tasa de LH bio-inmuno ha sido considerada como un índice independiente acerca de la calidad hormonal, y se ha logrado establecer que existe una variación implícita en este factor causada por los diferentes estados o procesos endocrinos. Estos cambios en el cociente bio-inmuno han sido interpretados como reflejo del cambio en el espectro de las isoformas secretadas de LH. Cuando los datos de LH inmunorreactiva y LH bioactiva son comparados, habiendo utilizado una misma preparación de referencia y los niveles de LH pudieron ser medidos con buena precisión, entonces se puede inferir que las variaciones en el cociente bio-inmuno son el reflejo de cambios en la combinación de glicofomas circulantes de LH (50,77).

Investigaciones que anteceden la propuesta de este trabajo han logrado definir una metodología capaz de estudiar el comportamiento de una población celular definida, con el

fin de conocer su respuesta específica ante un emisor dado (9,31,32,34,49,63,76), es decir, se puede influenciar un grupo de células, por ejemplo las de Leydig con LH previamente estudiada y definida, y conocer la calidad y cantidad de respuesta en la obtención de testosterona por parte de dichas células.

Recientemente, en el hombre se han realizado estudios en relación con el patrón de secreción pulsátil de la LH, FSH, prolactina, testosterona, cortisol, beta-endorfina, y otras. (24,39,63,111,122,126,128). A pesar de que estos estudios se han realizado utilizando protocolos, inmunoensayos y algoritmos diferentes, existe uniformidad en los conocimientos parciales a que se ha llegado con relación a la frecuencia de estas secreciones. Así por ejemplo, el patrón de secreción de LH es el que ha sido más ampliamente estudiado y se ha establecido que esta hormona tiene una frecuencia de secreción de un pulso cada 60-90 minutos (20.7 ± 1.8 pulsos/24 h), con una duración media de 50 ± 14 minutos por cada pico de concentración (89,91,97). Por otra parte, la LH bioactiva se secreta en pulsos con una duración media de 6.1 minutos a intervalos de 72 minutos (35).

El hecho de que todas las hormonas son secretadas en forma pulsátil u oscilatoria requiere el uso de métodos específicos capaces de cuantificar dichas variaciones temporales. Toda secreción hormonal involucra variaciones temporales, incluyendo las estacionales, variaciones circadianas y ultradianas y aquellas que pueden presentarse en el orden de minutos o menos. Se entiende por ultradiano a los límites en las variaciones que se producen en periodos menores al circadiano (20-28 h), refiriéndose a espacios o fracciones entre una y varias horas al día. El término circahoral es utilizado para concentrar la

atención en periodos de estudio alrededor de la hora (76,101). A tal efecto se han desarrollado algoritmos para identificar los pulsos en función del tiempo (representado en el perfil hormonal en forma de picos), los cuales son accesibles como programas de cómputo. Uno de ellos es el propuesto por Veldhuis y col, denominado desconvolución de parámetros múltiples, el cual permite el cálculo simultáneo de la cinética de secreción celular de determinada hormona así como su tasa de eliminación (119,120).

La desconvolución es una herramienta matemática útil en física, ciencias aplicadas y ciencias naturales para estimar el comportamiento particular de uno o más componentes de un proceso observado. Por ejemplo, en espectroscopía, la intensidad de una longitud de onda luminosa está influenciada por las propiedades de energía de la señal fluorescente inicial y la atenuación de la señal emitida durante su trayectoria hasta el punto de observación. El método de desconvolución intenta rescatar el estimado de la intensidad original de la descarga fluorescente. En términos generales, la desconvolución logra relacionar dos o más procesos mediante la función matemática de la integración de los factores a tiempos finitos, la cual se designa como una integral de desconvolución (119).

Todo fenómeno biológico es el resultado de varios procesos, dependientes o independientes entre sí, que contribuyen a la presentación del mismo. Tal es el caso del comportamiento de los metabolitos y las concentraciones hormonales a nivel del sistema circulatorio a través del tiempo, en el que las variaciones que se presentan en diversas concentraciones medidas en función del tiempo, son el resultado de por lo menos dos grandes eventos 1) la tasa de secreción del metabolito u hormona y 2) la magnitud y tipo de la cinética de eliminación de los mismos para ser removidos de la circulación. Un tercer

componente debe ser el efecto del ruido que se puede presentar tanto en el sistema como en el análisis. La desconvolución de estos dos eventos permite reconocer la concentración estimada como real en un momento determinado (52,59,76,118) **Figura 1**. Cuando la cinética de eliminación de una hormona en estudio es conocida con suficiente confiabilidad, la tasa de secreción puede ser obtenida utilizando modelos matemáticos a fin de remover los efectos de la distribución sistémica de la hormona, al igual que su degradación. De igual modo, el método de desconvolución logra definir con precisión aquellos límites temporales y de área de cada pulso (101) **Figura 2**.

Como se mencionó anteriormente, las concentraciones séricas de hormonas, medidas secuencialmente en el tiempo pueden ser consideradas como la resultante de diversas tasas de impulsos secretorios de moléculas de hormona hacia el torrente circulatorio, de la cinética de eliminación de la hormona, así como de cualquier factor de error en el experimento o variaciones biológicas no detectadas. La integral de desconvolución (figura 1) relaciona todos estos factores contribuyentes de la siguiente manera:

$$c(t) = \int s(z) e^{-(t-z)} dz + \epsilon$$

En donde $c(t)$ es la concentración de la hormona a un tiempo dado. $S(z)$ denota la función de secreción, la cual representa la tasa de entrada de las moléculas de interés al muestreo a través del tiempo, y especifica la masa de sustancia desarrollada en el sistema por unidad de volumen durante el intervalo estudiado. $e^{-(t-z)}$ describe la función de eliminación o la cinética de remoción de la sustancia en el espacio muestreado. ϵ se refiere a la variación aleatoria del experimento que contribuye como factor de confusión en la medición (52,59,118).

FIGURA 1.

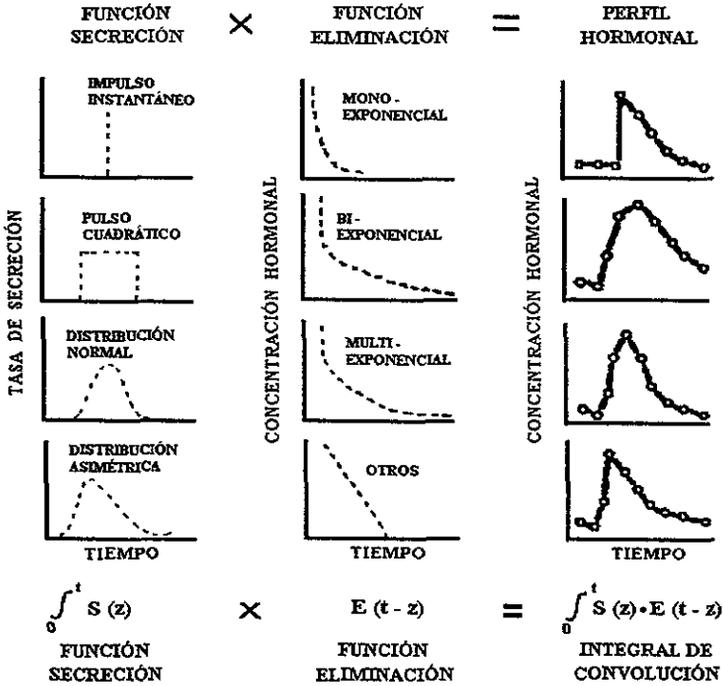
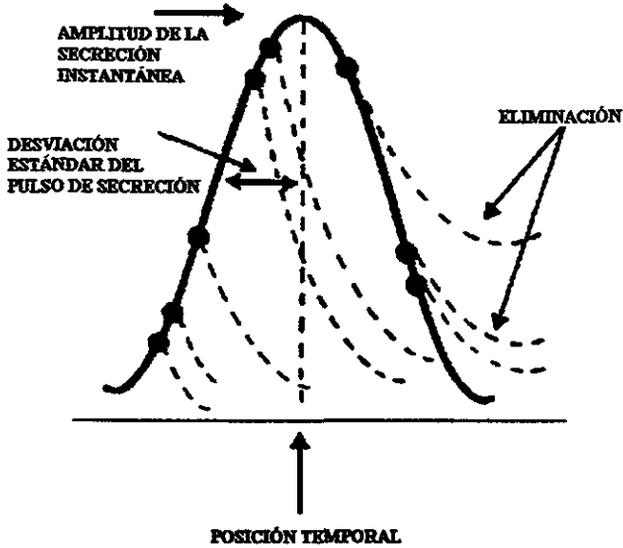


Ilustración que esquematiza el concepto de una integral de convolución, la cual es utilizada para especificar el efecto simultáneo de dos eventos operativos. En este caso, la función secreción (a la izquierda) y la función de eliminación (en el centro) son integradas y describen diferentes perfiles de concentración de hormonas o metabolitos en función del tiempo. Existe una variedad de posibilidades para la presentación del evento secretorio y de depuración, lo cual produce diversos efectos en el resultado del perfil obtenido en la integral de convolución. (Adaptación con permiso de Veldhuis, J.D. y Johnson, M.L., *Methods in Enzymology*, 20: 542, 1995.)

FIGURA 2.



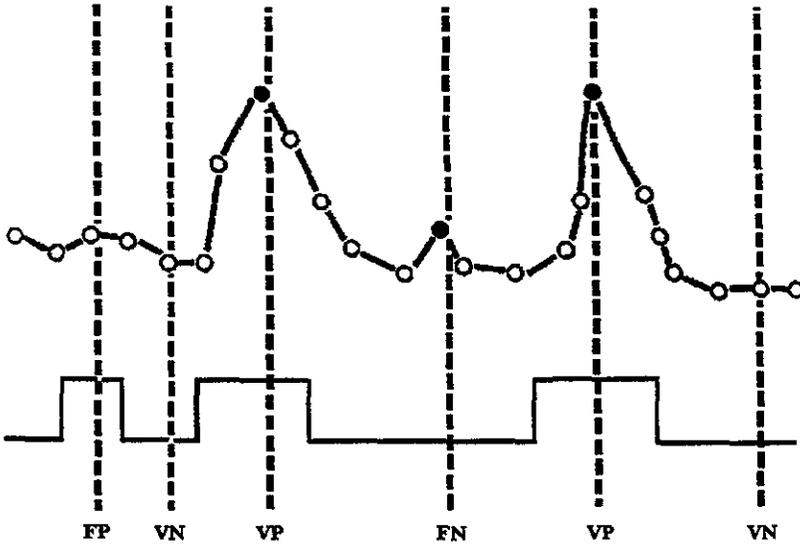
Diseño de un pulso hormonal con base en un modelo Gaussiano simétrico, presentando sus características cuantitativas relevantes: Amplitud máxima, duración media (igual a 2.354 D.E. en la posición de amplitud máxima de la curva), masa secretada (área bajo la curva), intervalo entre pulsos (valor entre dos posiciones temporales). Adaptación con permiso de Veldhuis, J.D. y Johnson, M.L., Methods in Enzymology, 20: 549, 1995.

Este método de desconvolución puede proveer de información contenida en el conocimiento de la señal secretora: a) algunos procesos de secreción pueden ser discretamente diferentes en sus pulsos con respecto a la duración, amplitud, forma y tiempo. b) El poder analítico del algoritmo puede aumentar cuando es posible remover todo efecto de confusión tanto en las condiciones del experimento, como en las tasas de eliminación metabólica de las hormonas. c) La cosecreción de dos o más hormonas puede ser analizada a pesar de las diferencias endógenas, aún cuando sean basales. d) Si la tasa de secreción de una hormona puede ser estimada a través de los datos recolectados, entonces la tasa de eliminación metabólica puede ser calculada (52,118).

Existen algunas limitaciones del método, como son: a) las series de concentración hormonal frecuentemente tienen mucha variación, ruido y señales reales desconocidas por el investigador, tal es el caso de la falta de conocimiento sobre la tasa de eliminación de las diversas isoformas contenidas en una hormona. b) Múltiples fuentes de varianza experimental pueden contribuir a distorsionar el resultado de un evento secretorio (52,118)

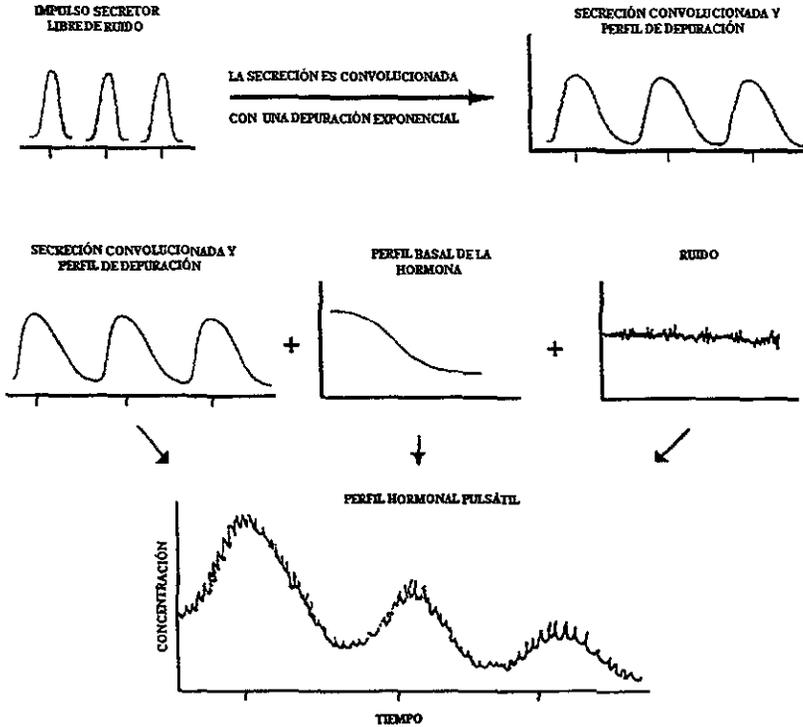
Figura 3. En resumen, la aplicación del método de desconvolución de parámetros múltiples permite el cálculo simultáneo de la cinética de eliminación endógena y de las tasas de secreción hormonal a través del cálculo de 4 parámetros del pulso de secreción: 1) número y localización en función del tiempo, 2) amplitud, 3) duración media; todos ellos relacionados con 4) la cinética de eliminación exponencial endógena específica para cada individuo en estudio (117,120). Estos pulsos de secreción hormonal se identifican previamente por un programa de análisis de grupos (cluster analysis), el cual localiza los puntos de inflexión significativos en series de datos, tomando en cuenta la varianza entre las muestras (117) **Figura 4.**

FIGURA 3.



Determinación del error tipo I y tipo II en una serie de tiempo al analizar un perfil hormonal. Se pueden definir tanto los falsos positivos (FP) en los pulsos detectados, causado esto por la varianza aleatoria experimental, así como picos verdaderos que no se estiman y se identifican como falsos negativos (FN). Los verdaderos positivos (VP) y los verdaderos negativos (VN) son picos y valles respectivamente bien estimados e identificados. (Adaptación con permiso de Veldhuis, J.D. y Johnson, M.L., Methods in Enzymology, 240: 387, 1994.)

FIGURA 4.



Obtención de un perfil hormonal pulsátil mediante modelos matemáticos. En suma, es la resultante de la construcción de una serie de tiempo utilizando la integral de convolución involucrando la función secretora y la función exponencial de eliminación. Este perfil de secreción - eliminación convolucionado es superpuesto con un perfil de valores basales y con otro referente al error experimental. La serie de tiempo final es producida por la adición de cada uno de los componentes. (Adaptación con permiso de Veldhuis, J.D. y Johnson, M.L., *Methods in Enzymology*, 240: 386, 1994.)

MATERIAL Y METODOS

Para este estudio fueron analizados dos grupos de individuos voluntarios, aparentemente sanos de acuerdo a examen físico, historia clínica y estudios de gabinete completos, sin tratamiento terapéutico y con edades que oscilaban entre 25 y 40 años. El primer grupo correspondió a 15 varones euspermicos fértiles que fueron invitados a participar en el estudio. Se definió como euspermico fértil a todo aquel individuo aparentemente sano que haya procreado un hijo en los tres años previos al estudio, y en el que los resultados de 2 espermatobioscopías directas realizadas con 2 semanas de diferencia y después de 3 días de abstinencia sexual, se encuentren dentro de los límites considerados como normales por la Organización Mundial de la Salud (143). Un segundo grupo en estudio consistió en 14 varones infértiles, pacientes de los hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social, con diagnóstico de oligoastenozoospermia idiopática, refiriéndose ésta al varón que manteniendo relaciones sexuales regulares y sin protección anticonceptiva con una misma pareja fértil no haya procreado un hijo en los tres años previos al estudio y, en el que, sin patología aparente que comprometa el eje hipotálamo - hipófisis - testículo, los resultados de 2 espermatobioscopías directas, realizadas con 2 semanas de diferencia y después de 3 días de abstinencia sexual, reporten una concentración espermática menor a 20 millones por mililitro y una movilidad celular menor al 40 % (143). Dichos pacientes aceptaron por escrito su participación en el estudio.

Todos los individuos fueron internados durante un periodo comprendido entre las 20:00 del viernes y las 21:00 del sábado. Aunque el estudio se realizó el día sábado, ingresaron la noche anterior para su adaptación al área física.

A partir de las 8:00 del día sábado se obtuvieron muestras de 6 ml de sangre periférica cada 10 minutos durante 12 horas. Las primeras ocho horas fueron para evaluar los valores basales de la LH bioactiva e inbioactiva. En este periodo, los pacientes podían desplazarse libremente en el área e ingerir sus alimentos. A fin de evaluar la respuesta de la hipófisis ante un estímulo hipotalámico en cuanto al incremento en la secreción de LH, al término de las primeras 8 horas de obtención de muestras se administraron a cada paciente 2 dosis endovenosas de 10 µg de GnRH, con un intervalo entre cada dosis de 2 horas, continuando con el muestreo durante las siguientes 4 horas. La recolección de las muestras finalizó a las 20:00, y en ese momento los pacientes fueron dados de alta, previa valoración clínica. La obtención de sangre se realizó mediante un catéter insertado en una de las venas cubitales y en cada muestreo se obtuvieron 6 ml, por lo que el volumen total de sangre obtenido de cada participante fue de 432 ml.

Cada muestra de sangre se dejó coagular a temperatura ambiente, para luego centrifugarla a 4°C con el objeto de obtener el suero, mismo que se guardó congelado a -70°C en alícuotas de 1 ml hasta su análisis correspondiente. Todas las muestras de un mismo paciente se analizaron en el mismo ensayo a fin de eliminar la variación interensayo.

La concentración de LH bioactiva se analizó en las muestras de suero mediante un bioensayo basado en la estimulación de la producción de testosterona por parte de células de Leydig de rata macho (31,32), cuyo procedimiento se describe a continuación: Se obtuvieron las células intersticiales a partir de testículos de ratas de raza Sprage Dawley de 12 semanas de edad, las cuales se incubaron en medio de cultivo 199 adicionado con 1 mg de colagenasa tipo IV, 10 mM de HEPES y 0.5 % de albúmina sérica bovina (BSA). Las células dispersadas se resuspendieron en medio Dulbecco (DMEM) con 1 mg/ml de

BSA, 0.125 mM de metil-isobutil-xantina y 100 UI/ml de heparina de sodio, con un volumen total de la dilución final de la suspensión celular de 10 ml por testículo. En cada ensayo se utilizaron 2 ratas, las cuales proporcionaron material suficiente para evaluar 24 muestras, controles y curva estándar. La incubación del bioensayo se realizó en viales de polietileno a 37° C, con agitación de 60 ciclos/min., bajo una atmósfera con 95 % de O₂ y 5 % de CO₂. Para la obtención de las concentraciones de la curva estándar, en cada vial se colocaron 1-1.5 x 10⁶ células intersticiales dispersadas en 2 ml de medio de cultivo, 0.1 ml de estándar de LH diluida en medio DMEM-BSA y 0.1 ml de suero sanguíneo libre de gonadotrofinas (obtenido de mujeres con terapia anticonceptiva oral). Cada concentración empleada para la curva estándar se incubó por triplicado. Para el análisis de las muestras de suero, en cada vial se colocaron 1-1.5x 10⁶ células intersticiales y 0.1 ml del suero sanguíneo a evaluar, por triplicado. Cada vez que se realizó el bioensayo se utilizaron como controles 3 sueros con concentraciones alta, media y baja de LH. El volumen final de incubación en todos los tubos fue de 2.2 ml, completándose éste con suero libre de gonadotrofinas. Las muestras de suero obtenidas después del estímulo con GnRH se analizaron en alícuotas equivalentes a 5 µl, previa dilución 1:25 de las muestras con suero libre de gonadotrofinas o BSA al 5 %. Después de incubar los viales por 3 horas, las suspensiones de células se centrifugaron a 1500 x g, por 15 min. Los sobrenadantes se almacenaron a -15° C o se diluyeron inmediatamente 1:20 con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) para la determinación de testosterona por RIA. La sensibilidad del bioensayo fue de 0.4 mUI/ml y el coeficiente de variación interensayo fue de 15%.

Fueron utilizados los datos correspondientes al valor de la LH inmunorreactiva, proveniente de los mismos pacientes, y en los mismos lapsos de obtención de muestras

séricas del presente trabajo. La metodología utilizada para la determinación de LH inmunológica fue la técnica de análisis radioinmunométrico IRMA (24,124,125).

ANALISIS DE LA LH CON EL METODO DE DESCONVOLUCION

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el uso de dos procedimientos matemáticos convertidos a paquetes computacionales, ambos diseñados por Veldhuis, Johnson y colaboradores (52,117,119,120,121). En primera instancia los datos correspondientes a las concentraciones séricas de LH bioactiva obtenidas durante el tiempo de muestreo fueron sometidos a un análisis de grupo (Cluster Analysis), algoritmo que permite localizar y analizar incrementos y/o decrementos significativos en series de datos, y diferenciarlos del error experimental asociado con las réplicas de datos que pudieran formar los posibles picos y nadires de la serie.

Posteriormente, se aplicó el método de desconvolución de parámetros múltiples, que consiste en resolver una integral de reconvolución (118) compuesta por los parámetros obtenidos durante una serie de tiempo, en la cual se aplica una función iterativa, seguido por la estimación no lineal de cuadrados mínimos de la mejor curva de regresión, en la cual se incluyen simultáneamente todas las concentraciones medidas durante un tiempo prefijado con sus correspondientes varianzas. Las estimaciones obtenidas por este sistema, incluyendo las medias aritméticas y sus límites de confianza estadísticos, representan las características de los pulsos de secreción tomando en cuenta las funciones de eliminación, cuyo resultado produce las variaciones en las concentraciones hormonales encontradas en el plasma. La integral convolucional que representa estos eventos de secreción y eliminación es la siguiente:

$$C(t) = \int S(z) E(t-z) dz \quad \text{Ecuación 1}$$

En donde:

$C(t)$ es la concentración de la hormona en suero en un tiempo t determinado;

$S(z)$ es la función de impulso, o la cantidad de hormona secretada por volumen de distribución unitario por unidad de tiempo, evaluada en cada tiempo z ;

$E(t-z)$ es la respuesta de la función de impulso, es decir, la cantidad de hormona eliminada durante el intervalo $(t-z)$.

Se asume que la función de impulso, la cual representa la velocidad de secreción en función del tiempo, está constituida por una serie de pulsos con amplitudes positivas ocurridas al azar durante el intervalo en que se hace el muestreo. Es posible considerar que por debajo de estos pulsos exista una secreción tónica que constituye una base común para los diferentes pulsos producidos. En su forma más simple, un pulso es definido como siguiendo una distribución al azar de velocidades de secreción instantáneas que siguen un patrón de tipo gaussiano. De acuerdo a esta concepción la forma matemática de $S(z)$ estará dada por la fórmula:

$$S(z) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-1/2 \left(\frac{z - Pp_i}{SD} \right)^2}$$

Donde:

A_i es la amplitud del i ésimo impulso secretor (masa de la hormona liberada por unidad de volumen de distribución por unidad de tiempo);

Pp_i es la posición en el tiempo del i ésimo impulso;

Z es el tiempo expresado en minutos;

i es el número del pulso estudiado en una serie dada, y

SD es la desviación estándar de la distribución gaussiana de las velocidades de secreción instantánea que forman un pulso.

La duración media de un pulso (o anchura media del pulso) es igual a 2.354 veces esta desviación estándar SD.

El término $E(t-z)$ puede ser razonablemente descrito por el modelo siguiente:

$$E(t-z) = e^{-[0.693(t-z)/HL]}$$

Donde HL es la vida media de la hormona previamente calculada.

Para minimizar la variación entre los datos observados y los calculados mediante la curva de reconvolución, se utilizó una estimación no lineal de cuadrados mínimos para determinar la mejor curva posible de estudio.

Para cada serie de datos (una por paciente/hormona) se calcularon los siguientes parámetros: concentración de la hormona en el tiempo cero; duración media de los pulsos de secreción (duración del pulso a la mitad de su amplitud máxima); vida media de la hormona; intervalo interpulsos; frecuencia (número de pulsos identificados/8 horas de muestreo); masa hormonal secretada por pulso; amplitudes (tasas máximas de secreción de cada pulso secretorio individual); tasa de producción o velocidad de secreción, y concentración media circulante. Haciendo uso de los resultados obtenidos de la LH inmunorreactiva y bioactiva, se realizó el cálculo del cociente de bioactividad-inmunoactividad de la LH en cada uno de los parámetros estudiados anteriormente, es decir vida media de la hormona, intervalo entre pulsos, masa secretada y amplitud por pulsos, tasa de producción, y concentración media circulante de LH, tanto para el grupo fértil como para el grupo de infértiles.

Además se calculó el valor de la masa secretada de LH antes y después de la administración exógena de GnRH (índice Pos-Pre), así como el valor de la masa secretada de LH en el primer y segundo pulso inducido por la administración exógena de GnRH.

ESTUDIO DE LA LH BIOACTIVA SIN PRETRATAMIENTO MATEMATICO

Con la finalidad de convalidar la técnica de análisis matemático propuesta por Veldhuis, Johnson y colaboradores, se realizó un estudio paralelo en el que los datos originales, tanto de la masa secretada de LH bioactiva como de la testosterona (obtenidos en un estudio clínico simultáneo con los mismos pacientes y en el mismo lapso de estudio), fueron utilizados para ser analizados estadísticamente, esta vez sin el pretratamiento del análisis de desconvolución, de tal forma que se realizaron consecutivamente los siguientes estudios: pruebas de autoregresión y análisis de series de tiempo.

Ambos estudios fueron practicados a los datos originales en cada uno de los grupos experimentales, euspermicos y oligospermicos. Debido a que resulta evidente la gran dependencia que existe entre un dato y todo dato vecino en cualquiera de las hormonas estudiadas, se hacía imprescindible tratar de independizar estadísticamente cada uno de los valores de la secuencia de estudio, motivo por el cual se realizó una prueba de normalidad por histograma de frecuencias de los datos obtenidos (48). Como el resultado de ese proceso fue que en el grupo de los hombres fértiles hubo un 23% de falta de normalidad en los datos y en el caso de los infértiles del 25%, se procedió a realizar una transformación logarítmica natural para los datos de LH bioactiva $LN(LHB)$ y de testosterona $LN(T)$, tratando de corregir con ello la falta de normalidad, disminuyendo la varianza de los datos en cada paciente, y con estos nuevos datos correr el siguiente análisis.

En el caso de la autoregresión, la prueba consistió en realizar una regresión lineal, siendo la variable dependiente los datos de la LH y testosterona dados en el tiempo, y como variable independiente los mismos datos de LH y testosterona respectivamente, pero desfasados entre uno y hasta ocho lapsos con respecto al original, a decir en el caso de la testosterona:

$LN T = f(LN T-1, LN T-2, \dots, LN T-8)$, o lo que es lo mismo:

$$LN T_i = \beta_0 + \beta_1 LN T_{i-1} + \varepsilon$$

$$LN T_i = \beta_0 + \beta_1 LN T_{i-2} + \varepsilon \dots$$

$$LN T_i = \beta_0 + \beta_1 LN T_{i-8} + \varepsilon$$

El objetivo de este procedimiento es obtener por medio de la técnica de mínimos cuadrados, la relación existente entre cualquier valor de LH y testosterona y el valor precedente, y por ende, la porción de cada valor en determinado tiempo de la secuencia de estudio que es independiente de todo valor precedido (48,101,138).

Asimismo se corrió una prueba de regresión lineal en la que la variable dependiente fue la testosterona (LN T) y las variables independientes fueron los valores desfasados de LH entre 10 y hasta 80 minutos antes de cada valor de la testosterona, es decir

$$LN T = f(LN LHB-1, LN LHB-2 \dots LN LHB-8)$$

Para el estudio de series de tiempo fue necesario aplicar a los datos originales la técnica de transformación por promedios móviles con la finalidad de analizar de igual modo que en el

estudio anteriormente descrito, la porción independiente de cada dato de la secuencia, tanto para la testosterona como para la LH bioactiva, así como su interacción.

Se corrieron análisis de promedios móviles de grado 3, 5, 7 y 9 para la LH bioactiva y para la testosterona, en los grupos de fértiles e infértiles, mediante la técnica descrita por Chou Ya-Lun (145) y que a continuación se resume utilizando el ejemplo de promedio móvil 5.

El estudio de series de tiempo se basa en desintegrar de los datos originales los cuatro componentes principales de una serie de datos dependientes entre sí: La tendencia (T), la variación cíclica (C), la variación estacional (S) y la variación irregular (I).

De la fórmula de la serie original, denominada:

$$Y = T \cdot C \cdot S \cdot I \quad (1)$$

Se puede obtener el componente T · C mediante la generación de los promedios móviles de grado 5, logrando que, al dividir la ecuación (1) entre T · C resulte

$$Y = S \cdot I \quad (2)$$

Si a la ecuación (2) se le extrae una media geométrica y se le divide entre ella (corrección por la media) se obtiene al final solamente el componente estacional de la serie original

$$Y = S \quad (3)$$

Debido a que la premisa fundamental del uso de los promedios móviles 5 utilizando sólo el factor estacional radica en presuponer que se deben presentar variaciones en el comportamiento de determinada hormona dentro del mismo individuo cada 50 minutos (5 lapsos de 10 minutos cada uno), los nuevos valores de la serie de cada uno de los

individuos en estudio son agrupados y promediados de la siguiente manera: grupo 1 (promedio del valor de la hormona en el minuto 10, 60, 110, 160, 210, 260, 310, 360, 410), grupo 2 (promedio del valor de la hormona en el minuto 20, 70, 120, 170, 220, 270, 320, 370, 420), así hasta el grupo 5. De esta forma se conformaron 5 promedios por cada individuo los cuales reflejan las variaciones totales de la hormona a lo largo del estudio.

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados están expresados como promedio aritmético \pm desviación estándar y mediana. Las diferencia de medias entre grupos para cada parámetro fue analizada mediante prueba de T de Student de dos colas con varianza distinta y muestreo impar. En algunos casos, como por ejemplo los datos de vida media, hubo necesidad de realizar comparaciones utilizando métodos no paramétrico como la prueba de Wilcoxon con suma de rangos impares. Todo valor de P menor a 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

En el estudio de multicolinealidad, utilizando las pruebas de regresión autoregresión de la transformación logarítmica de los valores de LHB y testosterona, se midió el coeficiente de correlación (R^2 ajustada) entre los valores.

En el caso de la serie de tiempo, teniendo ya todos los pacientes sus promedios de variaciones estacionales se realizó un análisis de varianza multifactorial el cual logró evaluar el efecto del tiempo en el que se presentan las variaciones en la concentración hormonal, el efecto de grupo de experimentación, fértiles e infértiles, y la interacción entre ellos.

RESULTADOS

Antes de presentar los resultados es importante hacer notar que en la mayoría de los parámetros medidos, los valores fueron muy dispersos en sus rangos, lo cual incidió en forma decisiva en la poca significancia del análisis estadístico. Dicha dispersión fue debida a la variación biológica que manifestaron los participantes en el experimento, aún cuando la inclusión de cada uno en el estudio se realizó bajo criterios estrictos de uniformidad de la muestra.

El estudio de la actividad biológica de la LH en su etapa de secreción espontánea, mostró que aquellos pacientes con oligoastenozoospermia presentaron una vida media de la hormona significativamente más larga que los individuos normales (cuadro 1). En términos generales, la LH tuvo una vida media en los varones fértiles de 93 minutos, y en los infértiles de 131 minutos.

El intervalo entre pulso no difirió entre los individuos normales y los oligospermicos, tanto en sus valores basales, como en aquellos después de la administración de la hormona GnRH. En el caso del cociente bio-inmuno de la hormona luteinizante antes de administrar la hormona GnRH, no presentó diferencias entre los grupos estudiados, siendo en ambos, la relación casi igual a la unidad (cuadro 2).

En el análisis de la frecuencia o cantidad de pulsos detectados durante las primeras ocho horas de muestreo con secreción espontánea de LH, se localizaron la misma cantidad de picos en ambos grupos y el cociente de bioactividad:Inmunoactividad no varió entre fértiles e infértiles (cuadro 3).

En el estudio de la masa secretada de LH bioactiva se encontró un aumento significativo en todos los individuos después de la administración de GnRH con respecto a sus valores basales, sin embargo no existieron diferencias entre grupos antes ni después del GnRH. La misma situación se presentó en los resultados del estudio del cociente bio-inmuno de la masa secretada de LH por pulso (cuadro 4), en el que se detectó que existen diferencias estadísticas de los promedios entre los individuos, antes y después de la administración de GnRH, pero no entre los grupos.

En el análisis de la amplitud por pulso se encontró que una vez aplicada las dosis de GnRH, todos los varones manifestaban incrementos significativos en los valores absolutos de cada parámetro con respecto a sus valores iniciales, pero en ningún momento se encontraron diferencias entre los individuos fértiles e infértiles. En el estudio del cociente bioactividad-inmunoactividad de la amplitud de los picos de LH se presentó una variación biológica en los datos, la cual produjo una desviación estándar elevada, causando con esto una diferencia no detectada estadísticamente (cuadro 5), sin embargo, la tendencia refleja que, tanto en los valores basales como en los valores estimulados por el GnRH, los varones fértiles presentaron mayor cociente de amplitud en cada pico de LH que los varones con oligoastenozoospermia.

En el estudio de la velocidad de secreción de la LH tampoco se logró detectar alguna diferencia entre grupos, de igual forma ocurrió en el análisis del cociente bio-inmuno, cabe resaltar que en este rubro la expresión de la bioactividad de la LH fue casi 5 veces superior a la inmunoactividad (cuadro 6).

Antes de la administración de GnRH la concentración media circulante de LH bioactiva se manifestó en cantidades similares en ambos grupos, sin embargo después del GnRH la concentración media circulante se detectó en mayor cantidad en los varones infértiles (69.33 ± 32.07 UI/L) con relación a los varones fértiles (50.08 ± 14.66 UI/L) con $P > 0.05$. Esta diferencia no fue detectada en el análisis de la inmunoreactividad de la LH. No se encontraron diferencias significativas entre cocientes en el estudio de la concentración media circulante de LH, pero está bien definida la relación de 5:1 entre la bioactividad y la inmunoreactividad (cuadro 7).

El análisis estadístico de los estudios de autoregresión del $LN\ LHB = f(LN\ LHB-1)$ demostró que tanto la R^2 ajustada del grupo de los individuos fértiles como de los infértiles fue suficientemente baja como para proseguir con el estudio de la comparación de los residuales proveniente de cada suma de cuadrados del análisis de varianza correspondiente a cada individuo, tomando en cuenta desfases de LHB de -2, hasta -8, como se planteó en un inicio (cuadro 8). De igual forma, la autoregresión realizada sobre el $LN\ T = f(LN\ T-1)$ presentó una pobre correlación en relación con lo esperado, en ambos grupos y sin diferencia significativa entre ellos (cuadro 9).

El realizar la regresión $LN\ T = f(LN\ LHB, LN\ LHB-1, LN\ LHB-2... LN\ LHB-8)$, se encontró que en prácticamente todos los casos, el coeficiente β_1 , correspondiente al valor de la pendiente que debe presentar cada modelo de curva de regresión ajustada, era un valor con nula significancia estadística debido a que el dato de su propia desviación estándar lo superaba en valor absoluto, por lo que no se pudo inferir algo importante mediante este proceso. Este mismo resultado se presentó en la regresión lineal utilizando el

desfase desde LN LHB-2 hasta LN LHB-8, motivo por el que no se colocan en el cuadro 10.

En el estudio de series de tiempo de la LH y testosterona durante el lapso de secreción espontánea de las hormonas, se detectaron inferencias estadísticas al efectuar los promedios móviles de grado 5, 7 y 9; en los tres promedios móviles, los valores absolutos de la LHB y la T resultantes fueron similares, así como la significancia de la diferencia estadística entre grupos. Bajo esta perspectiva se pudo constatar que en el caso de la concentración media circulante de LH bioactiva, hubo una diferencia altamente significativa entre los grupos, en donde los individuos normales secretaron menos LH que los individuos infértiles (esta diferencia no se logró detectar en el estudio del mismo parámetro al utilizar el método de desconvolución, descrito en el cuadro 7), mientras que en la producción de testosterona circulante, medida por RIA, los resultados fueron al contrario, los varones fértiles secretaron en forma altamente significativa mayor cantidad de hormona que los varones astenospermicos. Por otro lado, al analizar la influencia de la inducción con GnRH sobre la producción de LH y testosterona se encontró que si bien la LH no tuvo variantes entre grupos (tampoco se detectó esto en el cuadro 7), la testosterona secretada por los varones euspermicos fue estadísticamente mayor que la de los varones oligospermicos (cuadros 11 y 12).

CUADRO 1

VALOR DE LA VIDA MEDIA DE LA LH EN SECRECIÓN ESPONTANEA DURANTE 8 HORAS.

	VARONES FERTILES (n=15)		VARONES INFERTILES (n=14)	
	Bioactiva	Inmunoactiva	Bioactiva	Inmunoactiva
Promedio (minutos)	92.82 a	80.03 b	131.42 a	100.66 b
Desviación estándar	34.38	9.25	53.22	19.28
Mediana	89.31	79	131.11	97.5

Valores compartiendo literal son diferentes con $P < 0.005$

CUADRO 2

VALORES DEL INTERVALO ENTRE PULSOS DE LA LH Y DE SU COCIENTE DE BIOACTIVIDAD:INMUNOACTIVIDAD

	VARONES FERTILES (n=15)		VARONES INFERTILES (n=14)	
	Bioactiva	Inmunoactiva	Bioactiva	Inmunoactiva
<i>Durante secreción espontánea</i>				
Promedio (minutos)	101.22	80.97	109.92	103.19
Desviación estándar	19.69	15.72	24.07	22.68
Mediana	103	82.41	108	102
<i>Después del GnRH</i>				
Promedio (minutos)	112.2	87.16	123.35	110.36
Desviación estándar	8.2	6.59	14.34	12.82
Mediana	111	88.8	91.4	86
<i>Cociente Bio/Inmuno</i>		1.25		1.06

Las diferencias entre grupos no son significativas

CUADRO 3

**VALORES DE LA FRECUENCIA DE LOS PULSOS DE LA LH Y DE SU
COCIENTE DE BIOACTIVIDAD:INMUNOACTIVIDAD**
(Cantidad de pulsos en 8 horas de muestreo)

	VARONES FERTILES (n=15)		VARONES INFERTILES (n=14)	
	Bioactiva	Inmunoactiva	Bioactiva	Inmunoactiva
Promedio	4.2	4.1	3.9	3.7
Desviación estándar	0.9	1	0.85	0.76
Mediana	4	4	4	3.6
Cociente Bio/Inmuno	1.04		1.01	

Las diferencias entre grupos no son significativas

CUADRO 4

**VALORES DE LA MASA DE LH SECRETADA Y DE SU COCIENTE DE
BIOACTIVIDAD:INMUNOACTIVIDAD**

	VARONES FERTILES (n=15)		VARONES INFERTILES (n=14)	
	Bioactiva	Inmunoactiva	Bioactiva	Inmunoactiva
<i>Durante secreción espontánea</i>				
Promedio (UI/L)	11.95 a	1.96 c	13.12 b	2.85 c
Desviación estándar	7.23	0.78	6.8	1.42
Mediana	11.5	1.7	12.45	3.05
Cociente Bio/Inmuno	6.04 d		5.29 e	
<i>Después del GnRH</i>				
Promedio (UI/L)	59.97 a	13.92 f	60.34 b	19.61 f
Desviación estándar	32.99	5.1	39.21	8.8
Mediana	52.9	14	45.7	18
Cociente Bio/Inmuno	4.21 d		3.11 e	

Valores compartiendo literales iguales (a, c y f) son diferentes con $P < 0.05$

Valores compartiendo literales iguales (b, d y e) son diferentes con $P < 0.001$

CUADRO 5

VALORES DE LA AMPLITUD DEL PULSO DE LA LH Y DE SU COCIENTE DE BIOACTIVIDAD:INMUNOACTIVIDAD

	VARONES FERTILES (n=15)		VARONES INFERTILES (n=14)	
	Bioactiva	Inmunoactiva	Bioactiva	Inmunoactiva
<i>Durante secreción espontánea</i>				
Promedio (UI/L/minuto)	2.54 a	0.16	1.93 b	0.51
Desviación estándar	2.31	0.07	1.45	0.55
Mediana	1.5	0.14	1.45	0.32
<i>Cociente Bio/Inmuno</i>	15.85		3.71	
<i>Después del GnRH</i>				
Promedio (UI/L/minuto)	14.68 a	1.27	8.60 b	2.23
Desviación estándar	17.60	0.45	5.77	2.37
Mediana	7.9	1.2	6.5	1.715.85
<i>Cociente Bio/Inmuno</i>	11.51		3.85	

Valores compartiendo literal a son diferentes con $P < 0.01$

Valores compartiendo literal b son diferentes con $P < 0.001$

CUADRO 6

VALORES DE LA TASA DE PRODUCCION O VELOCIDAD DE SECRECION DE LA LH Y DE SU COCIENTE DE BIOACTIVIDAD:INMUNOACTIVIDAD

	VARONES FERTILES (n=15)		VARONES INFERTILES (n=14)	
	Bioactiva	Inmunoactiva	Bioactiva	Inmunoactiva
<i>Durante secreción espontánea</i>				
Promedio (UI/L)	46.53	9.81	44.32	11.09
Desviación estándar	20.97	3.61	19.22	6.39
Mediana	52	10.2	47	10.2
<i>Cociente Bio/Inmuno 8 horas</i>	4.97		4.82	

Valores compartiendo literales iguales son diferentes con $P < 0.001$

CUADRO 7

VALORES DEL CALCULO DE LA CONCENTRACION MEDIA CIRCULANTE DE LA LH Y DE SU COCIENTE DE BIOACTIVIDAD:INMUNOACTIVIDAD

	VARONES FERTILES (n=15)		VARONES INFERTILES (n=14)	
	Bioactiva	Inmunoactiva	Bioactiva	Inmunoactiva
<i>Durante secreción espontánea</i>				
Promedio (UI/L)	15.51 a	2.75	17.93 b	3.03
Desviación estándar	5.56	0.77	6.14	1.02
Mediana	16.6	2.5	18.4	3.1
<i>Cociente Bio/Inmuno</i>	5.94		5.87	
<i>Después del GnRH</i>				
Promedio (UI/L)	52.38 a c	10.18	69.33 b c	13.68
Desviación estándar	16.73	3.0	32.07	5.98
Mediana	44.9	13	66.3	13
<i>Cociente Bio/Inmuno</i>	5.77		5.12	

Valores compartiendo literales iguales son diferentes con $P < 0.05$

CUADRO 8

VALORES DEL COEFICIENTE DE CORRELACION AJUSTADA PARA LA REGRESION LN LHB = f(LN LHB-1) EXPRESADO EN PORCENTAJE

R ² VARONES FERTILES (n=15)	R ² VARONES INFERTILES (n=14)
56.67	22.31
47.55	53.83
30.28	11.91
7.76	46.31
41.12	71.68
56.97	0.75
15.76	43.99
56.02	32.93
40.39	44.61
24.38	81.82
49.51	6.81
16.62	56.11
67.12	48.46
23.32	52.18
56.67	
PROMEDIO 43.03	PROMEDIO 40.97

CUADRO 9

VALORES DEL COEFICIENTE DE CORRELACION AJUSTADA PARA LA REGRESION LN T = f(LN T-1) EXPRESADO EN PORCENTAJE

VARONES FERTILES R ² (n=15)	VARONES INFERTILES R ² (n=14)
26.63	56.99
4.21	50.56
1.22	10.73
3.8	6.4
73.84	32.11
47.89	42.68
68.01	12.77
43.84	3.53
33.18	57.75
17.56	75.51
60.83	51.72
21.06	19.95
32.53	64.12
44.09	62.24
26.62	
PROMEDIO 29.70	PROMEDIO 37.79

CUADRO 10

VALORES DEL COEFICIENTE β_1 Y ERROR ESTANDAR PARA LA REGRESION LINEAL $\ln T = f(\ln LHB, \ln LHB-1)$

VARONES FERTILES				VARONES INFERTILES			
β LHB	E.E.	β LHB-1	E.E.	β LHB	E.E.	β LHB-1	E.E.
-0.042	0.0138	0.0293	0.0144	0.0049	0.0072	0.0027	0.007
0.0029	0.0231	-0.003	0.023	-0.006	0.0088	-4E-4	0.0086
0.0404	0.0444	-0.036	0.0421	0.0093	0.0109	-0.003	0.0106
0.0226	0.0284	-0.025	0.0288	0.0074	0.1322	-0.038	0.1332
-0.023	0.0238	-0.019	0.0233	-0.018	0.014	-0.002	0.0141
0.2302	0.0908	-0.228	0.0968	-3E-4	0.0277	0.0597	0.0278
0.0218	0.0151	-0.014	0.0152	-0.012	0.0306	-0.022	0.0308
0.0261	0.0344	0.0069	0.0352	0.0357	0.0209	0.002	0.0216
-0.008	0.0132	-0.01	0.0134	0.0008	0.0172	-0.004	0.0172
-0.023	0.0391	-0.061	0.0378	0.1283	0.0853	0.0869	0.0867
-0.002	0.0145	-0.013	0.0145	0.0302	0.0255	-0.015	0.0258
0.0003	0.0245	0.0303	0.0237	0.005	0.0104	-0.002	0.0107
-0.003	0.0287	0.0136	0.0286	-0.031	0.0242	-0.026	0.024
0.0177	0.0177	-0.017	0.0176	0.0034	0.01	-0.011	0.01
-0.042	0.0138	0.0293	0.0144				

CUADRO 11

VALORES DEL CALCULO DE LA CONCENTRACION MEDIA CIRCULANTE DE LH BIOACTIVA UTILIZANDO EL METODO DE ANALISIS DE SERIES DE TIEMPO

	VARONES FERTILES (n=15)	VARONES INFERTILES (n=14)
<i>Durante secreción espontánea</i>		
Promedio (UI/L)	15.63 a c	18.53 b c
Desviación estándar	5.45	5.54
Mediana	16.6	18.4
<i>Después del GnRH</i>		
Promedio (UI/L)	53.17 a d	69.59 b d
Desviación estándar	17.82	34.16
Mediana	45.23	67.44

Valores compartiendo literales iguales (a, b, c y d) son diferentes con $P < 0.001$

CUADRO 12

VALORES DE LA MASA SECRETADA DE TESTOSTERONA CIRCULANTE UTILIZANDO EL METODO DE ANALISIS DE SERIES DE TIEMPO

	VARONES FERTILES (n=15)	VARONES INFERTILES (n=14)
<i>Durante secreción espontánea</i>		
Promedio (UI/L)	4.34 a	3.59 a
Desviación estándar	0.76	0.48
Mediana	4.3	3.55
<i>Después del GnRH</i>		
Promedio (UI/L)	4.53 b	3.74 b
Desviación estándar	0.72	0.28
Mediana	4.5	3.65

Valores compartiendo literales iguales son diferentes con $P < 0.001$

DISCUSION

En un intento de caracterizar mas detalladamente el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-testículo se evaluaron el patrón de secreción y la actividad biológica de la LH circulante antes y después de la administración de GnRH en varones fértiles y en individuos con oligoastenozoospermia idiopática, utilizando las técnicas de desconvolución de parámetros múltiples y análisis de grupos para comparar las características sutiles de la secreción de LH en ambos grupos.

En el presente estudio se observó que en el grupo de hombres infértiles, la LH bioactiva e inmunoactiva tuvieron una vida media más prolongada que la del grupo de varones fértiles. Así mismo, fueron comparados los valores obtenidos de la LH bioactiva con los valores de LH inmunoactiva de los mismos pacientes en igualdad de condiciones de estudio. El cociente de la LH bio-inmuno se utiliza para medir la diferencia en la manifestación del comportamiento entre los valores de la LH bioactiva y la LH inmunorreactiva, esta diferencia es más marcada en el momento del pico ondulatorio que en el nadir. Normalmente los valores de la LH bioactiva son superiores a los valores de la LH inmunorreactiva (38). Un aumento en la tasa bio-inmuno de la LH está relacionada con una secreción de mejor calidad de dicha hormona proveniente de una reserva hipofisiaria especial (45,46,77,78,82,84). En este sentido, la comparación indica que el cociente bio-inmuno de la amplitud de los pulsos de la LH producida fue significativamente menor en los pacientes infértiles que en el grupo testigo.

Debido a esta diferencia, y a pesar de la prolongada vida media del grupo infértil, el menor cociente bio-inmuno sugiere que la biopotencialidad de la LH secretada es menor en el

grupo de hombres infértiles que en el grupo de individuos con actividad reproductiva normal, es decir, que probablemente en el hombre normal se presente una mayor tasa de secreción de LH con respecto al hombre infértil. Estas diferencias pueden reflejar la liberación de una isoforma de LH relativamente más ácida, con mayor vida media y con menor bioactividad en pacientes con síndrome de oligoastenozoospermia idiopática (83). Estas isoformas ácidas de la hormona luteinizante parecen predominar en la hipófisis, plasma sanguíneo y orina cuando las concentraciones circulantes de hormonas esteroides están disminuidas (57,139), pero su identificación en este tipo de pacientes varones requiere de más estudio.

Existen diversas isoformas de LH, mismas que poseen propiedades distintas unas de otras. Informes recientes proponen que las isoformas básicas de la LH están asociadas con una gran actividad biológica y corta vida media *in vivo* (38,46,139). Mitchell y col. (77) informaron que en hombres recibiendo tratamientos de hemodiálisis se presentó una proporción mayor de formas ácidas de LH (inferido por la prolongación de la vida media de la hormona) con respecto al grupo testigo, particularmente en los valores más altos en el cociente bio-inmuno con relación a la masa secretada, los cuales oscilaban entre 5.5 – 6.25.

Una posible explicación de la variación en la respuesta bioactiva de la LH con respecto a la respuesta inmunoactiva es la diferencia de afinidad del receptor de LH de la rata macho a las diversas isoformas presentes en la LH de la sangre periférica del humano. Se tiene bien establecido que las moléculas de LH de diferentes especies difieren en sus afinidades con relación a los receptores de LH de una especie determinada. A pesar de estas diferencias, se ha logrado determinar una correlación entre los resultados de LH circulante proveniente

de ensayos biológicos y ensayos inmunoradiométricos e inmunofluorométricos por encima del 93% (45,78)

Tsatsoulis y col. (104) encontraron una fuerte correlación negativa entre los niveles de testosterona circulante y el cociente bio-inmuno de la LH, y propusieron que la retroalimentación negativa de la testosterona reduce no solo la cantidad de LH secretada, sino también su actividad biológica. Este hallazgo concuerda con valores inferidos de la determinación de LH bioactiva en hombres tratados con flutamida, un antagonista de los receptores androgénicos, utilizando un bioensayo de secreción de testosterona a partir de células intersticiales de rata macho, en los que de forma contundente se presentó una retroalimentación negativa mediada por andrógenos (38,134).

En el estudio de la testosterona y la LH por medio del análisis de series de tiempo, se encontraron niveles circulantes significativamente más altos en el caso de la hormona luteinizante y más bajos de testosterona en el grupo de hombres infértiles, lo cual hace posible pensar que en los individuos infértiles se presente un proceso de sobreproducción compensatoria de hormona luteinizante, y como respuesta, tratar de secretar cantidades adecuadas de testosterona sin lograr alcanzar la necesaria para un desempeño acorde a los requisitos de una espermatogénesis normal. Se ha demostrado que la concentración de la LH bioactiva está regulada por hormonas esteroides, y que la disminución en la concentración de testosterona produce un aumento en la concentración de estas moléculas glucoproteicas (83,128). En este estudio se pudo constatar que la concentración de testosterona en los varones infértiles tendió a ser menor que en el grupo control, lo cual además de interferir con el desarrollo de la espermatogénesis también puede afectar la movilidad espermática, ya que esta propiedad se obtiene durante el trayecto epididimario,

lugar donde se produce el proceso de maduración, dependiente de la testosterona. Este hecho permite inferir que la mayor cantidad de LH bioactiva encontrada en el grupo de pacientes infértiles, medida ésta por la masa secretada (cuadro 6) y por la concentración media circulante de LH (cuadro 14), se debe a que la concentración media de testosterona es menor que en los varones euspermicos fértiles (23). Se requieren mas estudios para explorar los mecanismos de esta regulación ya que actualmente no se sabe hasta que punto se lleva a cabo a través de la modulación pulsátil de GnRH y/o por una acción directa de los andrógenos en las células gonadotróficas.

Estudios anteriores han demostrado que entre un 15-18% de los pulsos de LH analizada inmunológicamente pueden ser discordantes de los pulsos de LH bioactiva. También se ha demostrado que el promedio de la amplitud del pico de LH bioactiva en hombres fértiles es 2.6 veces más grande que la amplitud de la LH sérica medida inmunológicamente, mientras que el intervalo entre pulsos y la duración del pulso son similares (77,78). En otra investigación se logró detectar que al utilizar dos diferentes métodos de análisis inmunométrico (IRMA e IFMA), se presentaron resultados solamente parecidos, lo que hace pensar que las subunidades beta confieren heterogeneidad a la LH, la cual juega algún papel en la antigenicidad ante el inmunoensayo (38). Haavisto y col. (46) encontraron una forma inmunológicamente anómala de LH, la cual no es detectada por inmunoensayos que utilizan anticuerpos monoclonales, por lo que se presenta una inmunorreactividad aberrante. Esta forma variante de LH es causada por la mutación de dos codones en el gen que codifica a la subunidad beta de la LH. Uno de ellos introduce una señal extra de glicosilación a la cadena de la subunidad beta.

Otras investigaciones han demostrado que los análisis inmunológicos, IRMA y RIA, tienden a sobrestimar, desestimar, o aún, hasta imposibilitan la estimación de los valores reales de la LH sérica en algunos pacientes, por lo que concluyen que las determinaciones de la LH inmunológica pueden ser engañosas en algunos casos clínicos (30,77,125,134).

Se ha sugerido que las mediciones de la LH bioactiva proveen mas información de carácter cualitativo que los ensayos inmunológicos en muchos casos clínicos, como por ejemplo, la impotencia y el síndrome de ovario poliquístico, así como durante los tratamientos con hormona liberadora de gonadotrofinas (30).

En general, el incremento en el cálculo del cociente bio-inmuno en cada pulso de LH puede deberse a factores técnicos, como por ejemplo una subestimación de los niveles de LH inactivo, o pueden indicar que en hombres normales cada pulso se enriquece con una forma mas biopotente por parte de la molécula. Adicionalmente, la amplificación de la señal del pulso detectado de LH por medio del bioensayo de células intersticiales de rata macho puede resultar en una sensibilidad y especificidad desigual en comparación con la detección del pico de LH por inmunoanálisis. Las discrepancias entre la LH bioactiva y la inactivo en este estudio pueden contribuir a entender el significado de las diferencias presentadas en diversas investigaciones anteriores en las que reportan intervalos interpulsos menores en hombres infértiles (136), mientras que otros demuestran lo contrario (6). Los resultados presentes indicaron que no hubo diferencia significativa entre grupos en el caso del parámetro intervalo entre pulsos, motivo que permite inferir que la posible patología en los individuos infértiles reside a nivel del testículo y no en el eje hipotálamo-hipófisis.

Es probable que las alteraciones encontradas en la secreción pulsátil de LH en la sangre periférica de los pacientes infértiles se deban a una disminución en la velocidad de activación del generador hipotalámico de pulsos de GnRH, lo que incrementa la cantidad de LH secretable en cada evento (83,124). Las características cualitativas de la hormona también son diferentes en estos pacientes, ya que como se mencionó es posible que se trate de una isoforma más ácida, puesto que su vida media es mayor. No se conocen aún las bases de la reducción observada en el evento secretorio, pero alteraciones semejantes se han observado en casos de hipogonadismo asociado con falla renal crónica (124).

Después de la administración parenteral de GnRH, la masa secretada de LH aumentó significativamente en ambos grupos estudiados, lo que podría atribuirse a la mayor amplitud de los pulsos (tasa máxima de secreción de LH); sin embargo, estos efectos fueron mucho más evidentes en el grupo de hombres infértiles. Este hallazgo podría sugerir la existencia de alguna deficiencia en las células de Leydig, ya que es probable la presencia de una disminución en la retroalimentación negativa por testosterona en estos pacientes, que podría traducirse en un aumento en las reservas intrahipofisiarias de LH.

Es interesante mencionar que la masa de LH secretada fue significativamente menor en el segundo pulso de GnRH exógeno comparado con el primero, lo que sugiere a) desensibilización de la hipófisis con la administración parenteral de dos dosis consecutivas de GnRH; b) agotamiento de las reservas secretables de LH, o c) disminución de la síntesis de LH después de la aplicación de la segunda dosis.

Todo trabajo de investigación debe tener unas condiciones óptimas en la colección de datos, no solo para maximizar la sensibilidad y especificidad de la prueba, sino para asegurar la confiabilidad y validez de cada estimación.

Cualquier variabilidad biológica de un muestreo *in vivo* o *in vitro* a través del tiempo debe ser tomada en cuenta. En efecto, toda estimación de la confiabilidad intrínseca de un estudio sistémico variará dependiendo de las características de los parámetros a observar. Un ejemplo de ello lo constituye el hecho de que los valores de la concentración media circulante de la LH sérica se mantuvieron relativamente estables durante el estudio, sin embargo se presentaron amplias diferencias cuando se analizaron las frecuencias y amplitudes de los mismos pulsos secretores, aun en los mismos individuos.

Otro detalle a considerar es que durante el desarrollo del análisis de los datos, hubo individuos fértiles en los que, a pesar de contar con los requisitos en los criterios de inclusión para el estudio, sus patrones de secreción de LH bioactiva e inmunorreactiva y por ende de testosterona no se comportaron como la mayoría de los individuos en su grupo, sino que parecían más sujetos del grupo de infértiles.

Ahora bien, es importante recalcar que el desarrollo de estas técnicas para la optimización del análisis hormonal permite abrir nuevos campos de investigación en la endocrinología reproductiva veterinaria, ya que define con más precisión las alteraciones cuantitativas y cualitativas en las concentraciones hormonales que deriven de modificaciones en el estado fisiológico o patológico de un individuo y que con la metodología utilizada actualmente se hace más complicada su estimación, lo anterior se debe a que por la naturaleza dinámica de los mecanismos neuroendocrinológicos que modulan la secreción de LH y FSH, los

resultados de una sola muestra de sangre periférica tomada al azar pueden ser muy difíciles de interpretar. Por ejemplo, en virtud del patrón pulsátil de la secreción de LH en los individuos sanos, el estudio de una sola muestra de sangre proporciona un cálculo inexacto de la media de las concentraciones diarias de LH en suero (85,106,109,114,115,116,135). Por lo tanto, una determinación más precisa de este valor promedio, requiere del estudio de muestras de sangre obtenidas por un periodo de cuando menos 6 horas seguidas, lo que proporciona un resultado con una precisión de $\pm 20\%$. A pesar de que los niveles de LH y testosterona en suero sanguíneo presentan variaciones importantes en un periodo de 24 horas (125,128), la media de las concentraciones de FSH en la sangre periférica varía en una proporción menor durante el transcurso del día o la noche (125). De este modo, las variaciones circadianas de las concentraciones séricas de FSH no afectan significativamente la valoración de la LH.

Las concentraciones totales de testosterona en el suero sanguíneo de individuos jóvenes sanos, varían cuando menos 35% entre las horas de la mañana y de la noche (128). Sin embargo, la magnitud de esta variación en la concentración de testosterona en 24 horas puede disminuir significativamente durante el envejecimiento (102). Con la finalidad de estandarizar el muestreo de sangre para la determinación ocasional de testosterona, éste debe efectuarse temprano por la mañana, ya que la mayoría de los valores normales reportados se han derivado de muestras de sangre obtenidas en este momento del día. Además debido a que diferentes condiciones clínicas, incluyendo entre otras la obesidad y el envejecimiento, pueden alterar significativamente la concentración de la globulina transportadora de las hormonas sexuales en el suero sanguíneo (40,102,135), se ha recomendado que las valoraciones de testosterona libre se realicen mediante diálisis de

equilibrio, o sea la determinación de la concentración biodisponible de esta hormona esteroide en el suero (índice de testosterona libre-testosterona unida laxamente a la albúmina o a otras proteínas de baja afinidad del suero). De hecho, cambios discretos en la concentración de testosterona total en el suero pueden estar acompañados por variaciones más evidentes en el componente libre o biodisponible de la hormona (40,102,112,114,135). Mas aún, para una interpretación adecuada de las concentraciones de LH, la evaluación tanto de LH como de testosterona libre deben efectuarse en la misma muestra sanguínea, obtenida preferentemente por la mañana. Bajo estas circunstancias, un aumento en la proporción LH/testosterona indica una evidencia indirecta de falla de las células de Leydig, que puede ser parcial, moderada o completa. Por otra parte, si las concentraciones de testosterona en suero disminuyen debido a un defecto en la regulación hipotalámica o hipofisiaria del eje gonadotrófico, el producto de las concentraciones de LH y testosterona libre es bajo.

La medición absoluta de LH por medio de ensayos inmunológicos no siempre puede distinguir las concentraciones bajas de esta hormona de las concentraciones normales (31,105,106,109,135). Por lo tanto los valores de LH en suero sanguíneo que no sobrepasan el rango de concentración del adulto joven, en presencia de concentraciones bajas de testosterona, son indicativas de daño en la unidad hipotálamo-hipofisiaria. Este es un principio importante en la endocrinología reproductiva, ya que permite la identificación de una variedad de condiciones fisiopatológicas de hipogonadotropismo, de las cuales algunas son reversibles.

Al poner en práctica esta tecnología de análisis cuantitativo de los pulsos de las hormonas glicoproteicas se puede lograr un avance conceptual en el conocimiento del

funcionamiento normal del eje hipotálamo – hipófisis – testículo de las diversas especies animales, con la finalidad de constituir un panorama referencial ante cualquier desorden reproductivo que un individuo o población animal presente.

Estos resultados obligan a proseguir con el reto que ha representado el esclarecer la etiología de la oligoastenozoospermia idiopática; además, se confirma la necesidad de una mejor comprensión de los mecanismos de regulación paracrina y autocrina de la espermatogénesis humana, como consecuencia de la interacción de las hormonas gonadotróficas con la testosterona y con las células somáticas de la gónada masculina, para hacer preciso el diagnóstico y pronóstico de estos pacientes.

Aunque los resultados no son suficientemente concluyentes, es posible proponer que en este tipo de infertilidad, la sensibilidad del sistema neuroendocrino que modula la pulsatilidad gonadotrófica por medio de la retroalimentación vía andrógenos se comporta de manera discordante, siendo de suma importancia explorar aún más los mecanismos de dicha regulación, ya que actualmente se desconoce hasta que punto se lleva a cabo la regulación a través de la señal pulsátil por parte del GnRH y/o por una acción directa de la testosterona sobre las células gonadotróficas.

LITERATURA CITADA

1. Amaud, R., La Chance, R. and Dupont, A.: Serum luteinizing hormone (LH) biological activity in castrated patients with cancer of the prostate receiving a pure antiandrogen and in estrogen-pretreated patients treated with an LH-releasing hormone agonist and antiandrogen. J Clin Endocrinol Metab., 63: 297-302. 1986.
2. Baker, H.W.G., Santen, R.J. and Burger, H.G.: Rhythms in the secretion of gonadotropins and gonadal steroids. J. Steroid. Biochem., 6: 793-801. 1975.
3. Bardin, C.W.: The neuroendocrinology of male reproduction. In: Neuroendocrinology. Edited by Krieger, D.T. and Hughes, J.C., Sinauer Associates, Massachusetts, 1980, p. 239-247.
4. Bartlett, J.M.S., Jockenhovel, F. and Nieschlag, E.: New approaches to the pathophysiology of male infertility. Int. J. Androl., 12: 240-249, 1989.
5. Beitins, I.Z., Axeirod, L. and Ostrea, T.: Hypogonadism in a male with an immunologically active, biologically inactive luteinizing hormone: Characterization of the abnormal hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab., 52: 1143-1149. 1981.
6. Bennet, A., Bujan, L., Plantavid, M., Barbe, P., Caron, P. and Louvet, J.P.: Luteinizing hormone pulse frequency and in vitro bioactivity in male idiopathic infertility. Fertil. Steril., 55: 612-619, 1991.
7. Bex, F.J. and Corbin, A.: LHRH and analogs: reproductive pharmacology and contraceptive and therapeutic utility. In: Frontiers in Neuroendocrinology. Edited by Martini, L. and Ganong, W.F., Raven Press, New York, 1984, p. 85-151.
8. Bhasin, S., de Krester, D.M. and Baker, W.G.: Pathophysiology and natural history of male infertility. J. Clin. Endocrinol. Metab., 79: 1525-1529, 1994.
9. Bourad, N., Guillaumin, J.M., Bardos, P., Hochereau de Reviers, M.T., Drosdowsky, M.A. and Carreau, S.: Germ cell-Sertoli cell interactions and production of testosterone by purified Leydig cells from mature rat. J. Steroid. Biochem. Molec. Biol., 41: 677-681, 1992.
10. Brindley, G.S.: Deep scrotal temperature and the effect on it of clothing, air temperature, activity, posture and paraplegia. British J. Urol., 54: 49-53, 1981.

11. Bruno-Olmedo, S., van Zyl, J.A. and Oehninger, S.: Andrological consultation. In: Human Spermatozoa in Assisted Reproduction. Edited by Acosta, A.A., Swanson, R.J., Ackerman, S.B., Kruger, T.F., van Zyl, J.A. and Menkveld, R., Williams & Wilkins Baltimore MD, 1990, p. 24-25.
12. Burger, H.G. and de Krester, D.: The Testis. Raven Press, New York, 1981.
13. Calamera, J.C., Brugo, O.S. y Nicholson, R.F.: Metodología diagnóstica del factor masculino. En: Avances en Reproducción Humana. Editado por Asch, R. y Acosta A. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1990, p. 262-271.
14. Carani, C., Celani, M.F., Zini, D., Baldini, A., Della Casa, L. and Marrama, P.: Changes in the bioactivity to immunoreactivity ratio of luteinizing hormone in impotent men treated with testosterone undecanoate. Acta Endocrinol., 120: 284-287, 1989.
15. Carrere, C.A.: Factor masculino. Tratamiento. En: Avances en Reproducción Humana. Editado por Asch, R. y Acosta A. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1990, p. 272-295.
16. Clarke, I.J. and Cummins, J.T.: Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications. In: Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 1 Num 1. Edited by Burger, H.D. Bailliere Tindall, London, 1987, p. 1-21.
17. Clayton, R.N. and Catt, K.J.: Gonadotropin releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation and relationship to reproductive function. Endocrine Reviews, 2: 186-209, 1981.
18. Comhaire, F.H., de Krester, D.M., Farley, T.M.M. and Rowe, P.J.: Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. Inter. J. Androl., Suppl 7, 1987.
19. Conn, P.M., Hsueh, A.J.W and Crowley, W.F.J.: Gonadotropin releasing hormone: molecular and cell biology, physiology, and clinical applications. Molecular Pharmacology, 25: 51-55, 1984.
20. Corbin, A. and Bex, F.J.: Luteinizing hormone releasing hormone and analogues: conceptive and contraceptive potential. In: Progress in hormone biochemistry and pharmacology. Edited by Briggs, M. and Corbin, A., Eden Press, UK, 1980, p. 227-297.

21. Costagliola, S., Niccoli, P. and Carayon, P.: Glycoprotein hormone isomorphism and assay discrepancy: The paradigm of LH. J. Endocrinol. Invest., 17: 291-298, 1994.
22. Chase, D.J., Karle, J.A. and Fogg, R.E.: Maintenance or stimulation of steroidogenic enzymes and testosterone production in rat Leydig cells by continuous and pulsatile infusions of luteinizing hormone during passive immunization against gonadotrophin-releasing hormone. J. Reprod. Fert., 95: 657-667, 1992.
23. Chavarría, M.E., Díaz-Sánchez, V., McLachlan, R.L., Burger, H., Bremner, W., Rosado, A. and Reyes, A.: Inhibin shows different relationships with gonadotropins, steroids and semen analysis in fertile and infertile men. A.R.T.A., 4: 137-141, 1993.
24. Chavarría, M.E., Reyes Fuentes, A., Carrera, A., Aguilera, G. Rosado, A. y Veldhuis, J.D.: Estudio cinético de la pulsatilidad de la secreción de gonadotropinas en varones euspermicos fértiles e infértiles con oligoastenozoospermia idiopática. Ginecol. Obstet. Méx., 63, 74-89, 1995.
25. Chavarría, M.E.: Bases estructurales del espermatozoide humano infértil. Tesis de Doctorado. C.I.N.V.E.S.T.A.V. Universidad de Tlaxcala, 1995.
26. Childs, G.V., Ellison, D.G., Lorenzen, J.R., Collins, T.J. and Schwartz, N.B.: Immunocytochemical studies of gonadotropin storage in developing castration cells. Endocrinology, 111: 1318-1328, 1982.
27. Childs, G.V.: Fluidity of gonadotropin storage in cycling female rats. In: Hormonal Control of the Hypotalamo-Pituitary-Gonadal Axis. Edited by McKerns, A.W. and Naor, Z., Plenum, New York, 1984, p. 181-198.
28. Dahl, K.D. and Sarkissian, A.: Validation of an improved *in vitro* bioassay to measure LH in diverse species. J. Androl., 142: 124-129, 1993.
29. Davis, M.R., Veldhuis, J.D. and Rogol A.D.: Sustained inhibitory actions of a potent antagonist of gonadotropin-releasing hormone in postmenopausal women. J. Clin. Endocrinol. Metab., 64: 1268-1274, 1987.
30. Ding, Y.Q., Ranta, T., Nikkanen, V. and Huhtaniemi I.: Discordant levels of serum bioactive LH in man as measured in different *in vitro* bioassay systems using rat and mouse interstitial cells and human granulosa luteal cells. J. Endocrinol., 128: 131-137, 1991.

31. Dufau, M.L. and Veldhuis, J.D.: Pathophysiological relationships between the biological and immunological activities of luteinizing hormone. In: *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*. Edited by Burger, H.G. W.B. Saunders, Philadelphia PA., 1987, 153-176.
32. Dufau, M.L., Beitinz, I.Z., McArthur, J.W. and Catt, K.J.: Effects of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) upon bioactive and immunoreactive serum LH levels in normal subjects. J. Clin. Endocrinol. Metab., 43: 658-667, 1976.
33. Dufau, M.L., Pock, R., Neubauer A. and Catt, K.J.: *In Vitro* Bioassay of LH in human serum: The Rat Interstitial Cell testosterone (RICT) assay. J. Clin. Endocrinol. Metab., 42: 958-969, 1976.
34. Dufau, M.L., Veldhuis, J.D. and Fraioli, F.: Mode of secretion of bioactive luteinizing hormone in man. J. Clin. Endocrinol. Metab., 57: 993-1002, 1983.
35. Fabbri, A., Jannini, E.A., Ulisse, S., Gnassi, L., Frajese, G. and Isidori, A.: Low serum bioactive luteinizing hormone in nonorganic male impotence: possible relationship with altered gonadotropin-releasing hormone pulsatility. J. Clin. Endocrinol. Metab., 67: 867-875, 1988.
36. Finkelstein, J.S., O'Dea, L.S.T.L. and Whitcomb, R.W.: Sex steroid control of gonadotropin secretion in the human male. 1. Effects of estradiol administration in normal and gonadotropin-releasing hormone-deficient men. J. Clin. Endocrinol. Metab., 73: 621-628, 1991.
37. Fraser, H.M., Sharpe, R.M., Lincoln, G.A. and Harmer, A.J.: LHRH antibodies: their use in the study of hypothalamic LHRH and testicular LHRH-like material, and possible contraceptive applications. In: *Progress Towards a Male Contraceptive*. Edited by Jeffcoate, S.L. and Sandler, M., John Wiley, UK, 1982, p. 41-78.
38. Gandar, R. et Collin, D.: Activitè biologique de lutopine (LH). J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod., 23: 13-19, 1994.
39. Genazzani, A.D., Forti, G., Maggi, M., Milloni, M., Cianfanelli, F., Serio, M. and Rodbard, D.: Pulsatil release of prolactin and LH in normal man. *Serono Symposia from Raven Press*, 52: 253-265, 1988.
40. Glass, A.R., Swerdloff, R.S. and Bray, G.A.: Low serum testosterone and sexhormone globulin in massively obese men. J. Clin. Endocrinol. Metab., 45: 1211-1216, 1977.

41. Glover, T.D., D'Occhio, M.J. and Millar, R.P.: Male life cycle and seasonality. In: Marshall's Physiology of Reproduction, vol. 2. Edited by Lamming, G.E., Churchill Livingstone UK, 1990, p. 213-378.
42. Greenspan, S.L., Klibanski, A. and Chester Ridgway, E.: Pulsatile secretion of thyrotropin in normal subjects and in patients with thyroid disease. Serono Symposia from Raven Press, 52: 267-274, 1988.
43. Griffin, J.E. and Wilson, J.D.: Disorders of the testes and male reproductive tract. In: William's Textbook of Endocrinology, 7th ed., Edited by Wilson, J.D. and Foster, D.W., Saunders, Philadelphia, 1985, p. 259-311.
44. Guardabasso, V., de Nicolao, G., Rocchetti, M. and Rodbar, D.: Compute methods for analysis and stimulation of hormone pulses. Proceedings of Serono Symposia. Raven Press, 52: 231-243, 1988.
45. Haavisto, A., Petterson, K., Bergendahl, A. Perheentupa, A., Roser, J.F. and Huhtaniemi, I.: A supersensitive immunofluorometric assay for rat luteinizing hormone. Endocrinology, 132: 1687-1691, 1993.
46. Haavisto, A., Petterson, K., Bergendahl, M. Virkamaki, A. and Huhtaniemi, Y.: Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab., 80: 1257-1263, 1995.
47. Haisenleder, D.J., Katt, J.A., Ortolano G.A., et al: Influence of gonadotropin-releasing hormone pulse amplitude, frequency, and treatment duration on the regulation of luteinizing hormone (LH) subunit messenger ribonucleic acids and LH secretion. Mol. Cel. Endocrinol. 2: 338-343. 1988.
48. Hasser, N.B., La Salle, P. y Sullivan J.A.: Análisis matemático 2. McGraw-Hill, México, 1973, p. 643-667.
49. Hsueh, A.J.W.: Gonadotropin stimulation of testosterone production in primary culture of adult rat testis cells. Biochemical and Biophysical Research Communication, 97: 506-512, 1980.
50. Huhtaniemi, I., Ding, Y.Q., Tahtela, R. and Välimäki, M.: The bio/immune ratio of plasma luteinizing hormone does not change during the endogenous secretion pulse: Reanalysis of the concept using improved immunometric techniques. J. Clin. Endocrinol. Metab., 75: 1442-1449, 1992.

51. Jackacki, R.I., Kelch, R.P. and Sander, S.E.: Pulsatile secretion of luteinizing hormone in children. J. Clin. Endocrinol. Metab., 55: 453-458. 1982.
52. Johnson M.L. and Veldhuis J.D.: Evolution of deconvolution analysis as a hormone pulse detection method. Methods in Neurosciences, vol 28, Edited by Johnson, M.L. and Veldhuis, J.D. Academic Press, 1995, p. 1-24.
53. Kandeel, F.R. and Swerdloff, R.S.: Role of temperature in regulation of spermatogenesis and the use of heating as a method for contraception. Fertil. Steril., 49: 1-6, 1988.
54. Kapen, S., Boyar, R.M. and Finkestein, J.W.: Effect of sleep-wake cycle reversal on luteinizing hormone secretory pattern in puberty. J. Clin. Endocrinol. Metab., 39: 293-299. 1974.
55. Karnofsky, D.A.: Late effects of immunosuppressive anti-cancer drugs. Citado en: Chavarría, M.E.: Bases estructurales del espermatozoide humano infértil. Tesis de Doctorado. C.I.N.V.E.S.T.A.V. Universidad de Tlaxcala, 1995.
56. Karten, M. and Rivier, J.E.: Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. Endocrine Reviews, 7: 44-66, 1986.
57. Katt, J.A., Duncan, J.A., Herbon, L., Barkan, A. and Marshall, J.C.: The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. Endocrinology, 116: 2113-2115, 1985.
58. Keel, B.A., Grotjan and Jr. H.E.: Characterization of rat pituitary luteinizing hormone charge microheterogeneity in male and female rats using chromatofocusing: Effects of castration. Endocrinology. 117: 354-360. 1985.
59. Keenan, D.: Implementation of a stochastic model of hormonal secretion. Methods in Neurosciences, vol 28, edited by Johnson, M.L. and Veldhuis, J.D. Academic Press, 1995, p. 311-324.
60. King, J.A. and Millar, R.P.: Phylogenetic diversity of luteinizing hormone-releasing hormone. In: LHRH and its analogs. Edited by Nestor, J.J. and Vickery, B.H., MTP Press, Lancaster, 1987, p. 53-73.

61. Knuth, U.A., Honigl, W., Bals-Pratsch, M., Schleicher, G. and Nieslag, E.: Treatment of severe oligospermia with human chorionic gonadotropin/human menopausal gonadotropin: a placebo-controlled double blind trial. J. Clin. Endocrinol. Metab., 65: 1081-1085, 1987.
62. Kolodny, R.C., Masters, W.H., Kolodny, R.M. and Toro, G.: Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marijuana use. N. Engl. J. Med., 290: 872-873, 1974.
63. Kusler, R.H. and Brown, M.B.: A model for the identification of hormone pulses. Stat. Med., 10: 329-340, 1991.
64. Labrie, F., Auclair, C., Cusan, L., et al: Inhibitory effects of LHRH and its agonists on testicular gonadotropin receptors and spermatogenesis in the rat. Int. J. Androl., 2: 356-364, 1978.
65. Lejeune, H. Skalli, M., Sanchez, P., Avallet, O. and Saez, J.M.: Enhancement of testosterone secretion by normal adult human Leydig cells by co-culture with enriched preparations of normal adult human sertoli cells. Int. J. Androl., 16: 27-34, 1993.
66. Leong, D.A., Thomer, M.O. and Lau, S.K.: A potential code of LHRH-induced calcium ion responses in the regulation of luteinizing hormone secretion among individual gonadotropes. J. Clin. Endocrinol. Metab., 72: 916-922, 1991.
67. Leung, B.P., Karnard, A.H. and Negrini, B.P.: Differential regulation of gonadotropin by subunit messenger ribonucleic acids by gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in ewes. Mol. Cel. Endocrinol., 1: 724728, 1987.
68. Lincoln, G.A. and Short, R.V.: Seasonal breeding: nature's contraceptive. Recent Progress in Hormone Research, 36: 1-52, 1980.
69. Lipner, H.: Mechanism of mammalian ovulation. In: The Physiology of Reproduction. Edited by Knobil, E. and Neill, J. Raven Press Ltd., New York, 1988, p. 447-499.
70. Lipshultz, L.I.: Cryptorquidism in the subfertile male. Fertil. Steril., 27: 609-614, 1976.
71. Marshall, J.C. and Kelch, R.P.: Gonadotropin-releasing hormone: Role of pulsatile secretion the regulation of reproduction. New Engl. J. Med., 315: 1459-1468, 1986.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA 69

72. Matsumoto, A.M. and Bremner, W.J.: Modulation of pulsatile gonadotropin secretion by testosterone in man. J. Clin. Endocrinol. Metab., 59: 609-614. 1984.
73. Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R.M.G., Aimura, A. and Schally, A.V.: Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone 1. The proposed amino acid sequence. Biochemical and Biophysical Research Communication, 43: 1334-1339, 1971.
74. McIntosh R.P. and McIntosh, J.E.A.: Influence of characteristics of pulses of gonadotropin releasing hormone on the dynamics of luteinizing hormone release from perfused sheep pituitary cells. J. Endocrinol., 98: 411-421. 1983.
75. Merlin, H.E.: Azoospermia caused by colchicine: a case report. Citado en: Chavarría, M.E. : Bases estructurales del espermatozoide humano infértil. Tesis de Doctorado, C.I.N.V.E.S.T.A.V. Universidad de Tlaxcala, 1995.
76. Merriam, G.R. and Wachter, K.W.: Algorithms for the study of episodic hormone secretion. Am. J. Physiol., 243: E310-E316, 1982.
77. Mitchell, R., Bauerfeld, C., Schaefer, F., Schäfer and Robertson, W.R.: Less acidic forms of luteinizing hormone are associated with lower testosterone secretion in men on haemodialysis. Clin. Endocrinol., 41: 65-73, 1994.
78. Mitchell, R., Hollis, S., Crowley, V., McLoughlin, J., Peers, N. And Robertson, W.R.: Immunometric assays of luteinizing hormone (LH): Differences in recognition of plasma LH by anti-intact and β -subunit-specific antibodies in various physiological and pathophysiological situations. Clin. Chemistry, 41: 1139-1145, 1995.
79. Mulligan, T., Delamarre-Van De Wall, H.A., Johnson, M.L. and Veldhuis, J.D.: Validation of deconvolution analysis of LH secretion and half-life. Am. J. Physiol., 267 (Regulatory Integrative Comp. Physiol., 36): R202-R211, 1994.
80. Pavlou, S.N., Wakefield, G.B. and Island, D.P.: Suppression of pituitary-gonadal function by a potent new luteinizing hormone-releasing hormone antagonist in normal men. J. Clin. Endocrinol. Metab., 64: 931-936. 1987.
81. Plant, T.M.: Effects of orchidectomy and testosterone replacement treatment on pulsatile luteinizing hormone secretion in the adult rhesus monkey (*Macaca mulatta*). Endocrinology, 110: 1905-1913. 1982.

82. Partsch, C.J., Abrahams, S., Herhoiz, N., Peter, M., Veldhuis, J.D. and Sipell, W.G.: Variability of pulsatile LH secretion in young male volunteers. Acta Endocrinol., **129**: 201-205, 1992.
83. Reyes Fuentes, A. and Veldhuis, J.D.: Neuroendocrine physiology of the normal male gonadal axis. In: Endocrinology and metabolism Clinics of North America. Edited by Veldhuis, J.D. W.B. Saunders, Philadelphia, PA, 1993, p. 93-124.
84. Reyes Fuentes, A., Iranmanesh, A., Samojilk, E. and Veldhuis, J.D.: Differential regulation of pulsatile LH and FSH secretion and half-lives in idiopathic oligospermic men. J. Clin. Endocrinol. Metab., **83**: 1318-1322, 1996.
85. Santen, R.J.: Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in man?. J. Clin. Invest., **56**: 1555-1563, 1975.
86. Schanbacher, B.D.: Active immunization against LH-RH in the male. In: Immunological Aspects of Reproduction in Mammals. Edited by Crighton, D.B., Butterworths, London, 1984, p. 345-362.
87. Shaarawy, M. and Mahmoud, K.Z.: Endocrine profile and semen characteristics in male smokers. Fertil. Steril., **38**: 255-258, 1982.
88. Sharlip, I.D.: Clinical Andrology. In: General Urology. Edited by Smith, D.R., Lange Medical Pub. Los Altos CA, 1984, p. 608-609.
89. Sharpe, R.M. and McNeilly, A.S.: Differences between dispersed Leydig cells and intact testes in their sensitivity to gonadotrophin-stimulation *in vitro* after alteration of LH-receptor numbers. Mol. Cell. Endocrinol., **18**: 75-86, 1980.
90. Sharpe, R.M.: hCG-induced decrease in availability of rat testis receptors. Nature, **264**: 644-646, 1976.
91. Sharpe, R.M.: The hormonal regulation of the Leydig cell. In: Oxford Reviews in Reproductive Biology. Edited by Finn, C.A., Oxford University Press, 1982, p. 241-317.
92. Sharpe, R.M.: Intratesticular factors controlling testicular function. Biol. Reprod., **30**: 29-49, 1984.

93. Shecker, C.B., Matsumoto, A.M. and Bremner, W.J.: Testosterone administration inhibits gonadotropin secretion by an effect directly on the human pituitary. J. Clin. Endocrinol. Metab., **68**: 397-401. 1989.
94. Shupnik, M.A.: Effects of gonadotropin-releasing hormone on rat gonadotropin gene transcription in vitro: Requirement for pulsatile administration for luteinizing hormone-beta gene stimulation. Mol. Cell. Endocrinol., **4**: 1444-1450. 1990.
95. Smith, C.G. and Asch, R.H.: Drug abuse and reproduction. Fertil. Steril., **48**: 355-359. 1987.
96. Spiteri-Grech, J. and Nieschlag, E.: Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis- a review. J. Reprod. Fertil., **98**: 1-14, 1993.
97. Stanton, P.G., Pozvek, G., Burgon, P.G., Robertson, D.M. and Hearn, M.T.W.: Isolation and characterization of human LH isoforms. J. Endocrinol., **138**: 529-543, 1993.
98. Starzec, A., Counis, R. and Jutisz, M.: Gonadotropin-releasing hormone stimulates the synthesis of the polypeptide chains of luteinizing hormone. Endocrinology., **119**: 561-565. 1986.
99. Stillman, R.J., Rosenberg, M.J. and Sachs, B.P.: Smoking and Reproduction. Fertil. Steril., **46**: 545-547, 1986.
100. Storing, P.L. and Gaines Das, R.E.: The second international standard for human pituitary LH: its collaborative study by bioassays and immunoassays. J. Endocrinol., **138**: 345-359, 1993.
101. Sturis, J. and Van Cauter, E.: Techniques for assessing ultradian rhythms in hormonal secretions. *Methods in Neurosciences*, vol 28, Edited by Johnson, M.L. and Veldhuis, J.D. Academic Press, 1995, p. 139-155.
102. Tenover, J.S., Matsumoto A.M. and Clifton, D.K.: Age-related alterations in the circadian rhythms of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion in healthy men. J. Gerontol., **43**: 163-169. 1988.
103. Toovey, S., Hudson, W., Hendry, W.F. and Levi, A.J.: Suphasalazine and male infertility: reversibility and possible mechanism. Cited in: Chavarría, M.E.: Bases estructurales del espermatozoide humano infértil. Tesis de Doctorado, C.I.N.V.E.S.T.A.V. Universidad de Tlaxcala, 1995.

104. Tsatsoulis, A., Shalet, S.M., Talbot, A. and Robertson, W.R.: Quantitative and qualitative changes in LH secretion following pulsatile GnRH therapy in man with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism. Clin. Endocrinol., 30: 167-175, 1989.
105. Urban, R.J., Evans, W.S. and Rogol, A.D.: Acute androgen receptor blockade increases luteinizing hormone secretory activity in men. J. Clin. Endocrinol. Metab., 67: 1149-1154, 1988.
106. Urban, R.J., Evans, W.S., Rogol, A.D., Kaiser, D.L., Johnson, M.L. and Veldhuis, J.D.: Contemporary aspects of discrete peak-detection algorithms. 1. The paradigm of the luteinizing hormone pulse signal in men. Endocr. Rev., 9: 3-37, 1988.
107. Urban, R.J., Johnson, M.L. and Veldhuis, J.D.: In vivo biological validation and biophysical modeling of the sensitivity and positive accuracy of endocrine peak detection: 1. The LH pulse signal. Endocrinology, 124: 2541-2547. 1989.
108. Urban, R.J., Veldhuis, J.D. and Blizzard, R.M.: Attenuated release of biologically active luteinizing hormone in healthy aging men. J. Clin. Invest., 81: 1020-1029, 1988.
109. Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T. and Braunstein, G.D.: Gonadotropins and their subunits: Basic and clinical studies. Recent. Prog. Horm. Res., 32: 289-331. 1976.
110. Van Thiel, D.H., Gavalet, J.S., Smith, W.I. and Gwendolyn, P.: Hypothalamic-pituitary-gonadal dysfunction in men using cimetidine. N. Engl. J. Med., 300: 1012-1015, 1979.
111. Vance, M.L. and Thorner, M.O.: Fasting alters pulsatile and rhythmic cortisol release in normal man. J. Clin. Endocrinol. Metab., 68: 1013-1018, 1989.
112. Veldhuis, J.D. and Dufau, M.L.: Estradiol modulates the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. J. Clin. Invest., 80: 631-638. 1987
113. Veldhuis, J.D. and Dufau, M.L.: Clinical pathophysiology of bioactive luteinizing hormone secretion in man. In: Basic and Clinical Aspects Unexplained Infertility. Edited by L. Gnani. Raven Press, New York, 1989, pp: 237-254.
114. Veldhuis, J.D. and Evans, W.S.: Endocrine testing of gonadal function: Testes and ovary. In: Biochemical Tests in Functional Endocrine Pathology. Edited by Kovacs, K. and Asa, S.L.. Blackwell Scientific Publication, Boston, 1990, pp: 34-48.
115. Veldhuis, J.D., Evans, W.S. and Rogol, A.D.: Performance of LH pulse detection algorithms at rapid rates of venous sampling in humans. Am. J. Physiol., 247:554E-563. 1984.

- 116.Veldhuis, J.D., Evans, W.S. and Rogol, A.D.: Intensified rates of venous sampling unmask the presence of spontaneous high-frequency pulsations of luteinizing hormone in man. J. Clin. Endocrinol. Metab., 59: 96-104, 1984.
- 117.Veldhuis, J.D. and Johnson, M.L.: Cluster analysis: A simple, versatile and robust algorithm for endocrine pulse detection. Am. J. Physiol., 250: E486-E493, 1986.
- 118.Veldhuis, J.D. and Johnson, M.L.: Specific methodological approaches to selected contemporary issues in deconvolution analysis of pulsatile neuroendocrine data. Methods in Neurosciences, vol 28, Edited by Johnson, M.L. and Veldhuis, J.D. Academic Press, 1995, p. 25-89.
- 119.Veldhuis, J.D. and Johnson M.L.: Deconvolution analysis of hormone data. Methods in Enzymology, 210: 539-575, 1992
- 120.Veldhuis, J.D. and Johnson, M.L.: *In vivo* dynamics of luteinizing hormone secretion and clearance in man: Assessment by deconvolution mechanics. J.Clin. Endocrinol. Metab., 66: 1291-1300, 1988.
- 121.Veldhuis, J.D. and Johnson, M.L.: Testing pulse detection algorithms with simulations of episodically pulsatile substrate, metabolite, or hormone release. Methods in Enzymology, 240: 377-415, 1994.
- 122.Veldhuis, J.D., Evans, W.S., Johnson, M.L., Wills, M.R. and Rogol, A.D.: Physiological properties of the luteinizing hormone pulse signal: Impact of intensive and extended venous sampling paradigms on its characterization in healthy men and women. J. Clin. Endocrinol. Metab., 62: 881-891, 1986.
- 123.Veldhuis, J.D., Evans, W.S., Urban, R.J., Rogol, A.D. and Johnson, M.L.: Physiologic attributes of the luteinizing hormone pulse signal in the human, cross validation studies in men. J. Androl., 9: 69-77, 1988.
- 124.Veldhuis, J.D., Iranmanesh, A., Evans, W.S., Lizarralde, G., Thoner, M.O. and Vance, M.L.: Amplitude suppression of the pulsatile mode of immunoradiometric luteinizing hormone release in fasting-induced hypoadrenemia in normal men. J. Clin. Endocrinol. Metab., 76: 587-593, 1993.

125. Veldhuis, J.D., Iranmanesh, A., Johnson, M.L. and Lizarralde, G.: Twenty-four-hour rhythms in plasma concentrations of adenohypophyseal hormones are generated by distinct amplitude and/or frequency modulation of underlying pituitary secretory bursts. J. Clin. Endocrinol. Metab., 71: 1616-1622, 1990.
126. Veldhuis, J.D., Johnson, M.L. and Dufau, M.L.: Preferential release of bioactive luteinizing hormone in response to endogenous and low dose exogenous gonadotropin-releasing hormone pulses in man. J. Clin. Endocrinol. Metab., 64: 1275-1282, 1987.
127. Veldhuis, J.D., Johnson, M.L. and Dufau, M.L.: Physiological attributes of endogenous bioactive luteinizing hormone secretory bursts in man. Am. J. Physiol., 256: E199-E207, 1989.
128. Veldhuis, J.D., King, G.C., Urban, R.J., Rogol, A.D., Evans, W.S., Kolp, L.A. and Johnson, M.L.: Operating characteristics of male hypothalamo-pituitary-gonadal axis: pulsatile release of testosterone and follicle stimulating hormone and their temporal coupling with luteinizing hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab., 65: 929-941, 1987.
129. Veldhuis, J.D., Rogol, A.D. and Samojlik, E.: Role of endogenous opiates in the expression of negative feedback actions of estrogen and androgen on pulsatile properties of luteinizing hormone secretion in man. J. Clin. Invest., 74: 47-55. 1984.
130. Veldhuis, J.D., Sowers, I.R. and Rogol, A.D.: Pathophysiology of male hypogonadism associated with endogenous hyperestrogenism: Evidence for dual defects in the gonadal axis. New Engl. J. Med., 312:1371-1386. 1985.
131. Veldhuis, J.D., Urban, R.J. and Beitins, I.: Pathophysiological features of the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. J. Steroid. Biochem., 33: 739-748. 1989.
132. Veldhuis, J.D., Urban, R.J. and Dufau, M.L.: Evidence that androgen negative feedback regulates: hypothalamic GnRH impulse strength and the burst like secretion of biologically active luteinizing hormone in men. J. Clin. Endocrinol. Metab., 74: 1227-1235. 1992.
133. Veldhuis, J.D., Urban, R.J. and Lizarralde, G.: Attenuation of luteinizing hormone secretory burst amplitude is a proximate basis for the hypoandrogenism of healthy aging in men. J. Clin. Endocrinol. Metab., 75: 52-58. 1992.
134. Veldhuis, J.D., Urban, R.J. and Dufau, M.L.: Differential responses of biologically active luteinizing hormone secretion in older versus young men to interruption of androgen negative feedback. J. Clin. Endocrinol. Metab., 79: 1763-1770, 1994.

135. Veldhuis, J.D.: The dynamics of hypothalamic-pituitary-testicular axis. In: Reproductive Endocrinology. Edited by Yen, S.S.C. and Jaffe, R.B. W.B. Saunders, Philadelphia, PA. 1991, p. 409-459.
136. Wagner, T.O.F., Brabant, G., Warsch, F. and Von Zur Muhlen, A.: Slow pulsing LH in oligospermia. Acta Endocrinol. 105 (Supl. 264), 152, 1984.
137. Warner, B.A., Dufau, M.L. and Santen, R.J.: Effects of aging and illness on the pituitary testicular axis in men ; Qualitative as well as quantitative changes in luteinizing hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab., 60: 263-268. 1985.
138. Wiberg, D.M.: Espacio de estado y Sistemas Lineales. Serie Schaum, McGraw-Hill, México, 1973, p191-208.
139. Wilson, C.A., Leigh, A.J. and Chapman, A.J.: Gonadotrophin glycosilation and function. J. Endocrinol., 125: 3-14, 1990.
140. Winters, S. and Troen, P.: Testosterone and estradiol are co-secreted by the human testis. J. Clin. Invest., 78: 870-876. 1986.
141. Winter, S. and Troen, P.: Reexamination to pulsatile luteinizing hormone secretion in primary testicular failure. J. Clin. Endocrinol. Metab., 57: 432-435. 1983.
142. Winters, S. and Troen, P.: Evidence for a role of endogenous estrogen in the hypothalamic control of gonadotropin secretion in men. J. Clin. Endocrinol. Metab., 61: 842-845. 1985.
143. World Health Organization: Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Univ. Press, Cambridge, 1987.
144. World health Organization: Special Programme of Human Reproduction. Annual Report. 1988.
145. Ya-Lun, Ch.: Análisis Estadístico. 2da. Edición, Interamericana, México, 1977, p. 613-651.