



Universidad Nacional
de
La Plata

**Estudio de la capacidad funcional
endocrina del testículo en el primer mes
de vida.**

Carlos E. Milani

Padrino de Tesis: Dr. Rodolfo Rey

**Maestría en Bioquímica, método, diagnósticos y
fisiopatología endocrina.**

Directores de la Maestría: Dr. Ricardo S. Calandra
Dr. Mario A Pisarev

Octubre de 2006



**Instituto de Análisis Clínicos
Dr. H. A. Milani
Junín**



**Hospital Zonal de Junín
Dr. Abraham Piñeyro**



**Clínica Médico Quirúrgica
Sanatorio Junín**

**Centro de Investigaciones
Endocrinológicas
Hospital de Niños R. Gutiérrez
Buenos Aires**



Agradecimientos

Agradezco en primer término al Dr. Rodolfo Rey el haberme recibido para trabajar con él y compartimos su invaluable tiempo, su guía, consejos y correcciones que se realizaron a lo largo de este trabajo. Al Dr. Ignacio Bergadá por despertar en mí nuevas inquietudes y ampliar el horizonte inicial del trabajo.

A todos los miembros del CEDIE, en especial a la Directora Dra. Marta Barontini por que me abrió las puertas del Centro poniendo todo a disposición desde la primera entrevista, donde explicó los principios de trabajar en la institución con una gran firmeza, pero con una gran cordialidad, la misma que recibí de todos los integrantes del lugar. A la Dras. Patricia Bedecarrás, María Gabriela Ropelato y María Gabriela Ballerini por los trabajos de laboratorio. A la Dra. Stella Campo que se interesó y preocupó siempre por mis preguntas dando una respuesta suave y precisa, lo mismo que a la Dra. Silvia Gottlieb.

A la Sra. Silvia Fragole, en el Hospital de Junín, y a la Sra. Rosa Guiñazú, en el Sanatorio Junín, por el seguimiento técnico de los pacientes que participaron del estudio y a la Sra. Perla Rossano por su apreciada asistencia técnica.

A los directivos de las Instituciones que permitieron mi concurrencia y a todo el personal médico y de enfermería de ellas, en especial a las áreas de pediatría por su colaboración; el Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez”, el Hospital Zonal de Agudos de Junín “Dr. Abraham Piñeyro”, y la Clínica Médico Quirúrgica Sanatorio Junín.

Deseo también expresar mi gratitud a todo el Instituto de Análisis Clínicos “Dr. Héctor A. Milani”: tanto a los directores, con quien comparto la dirección como al resto del personal profesional y técnico, por la disposición financiera durante estos años, por suplirme durante mis ausencias, y por colaborar en la preparación de las muestras.

Por último quisiera tener unas palabras de gratitud para mi familia, mi esposa, Nora, que hace 40 años que me acompaña y a mis hijos Flavia, Pablo y Vicente, que me apoyaron permanentemente; y recordar a mi madre Flavia, Farmacéutica, y a mi padre Héctor Antonio, Dr. en Química, que fallecieron durante este trabajo, pero a lo largo de toda su vida me dieron ejemplos de rectitud y hombría de bien, como también los principios de observación y precisión de toda base científica, como él lo hizo con la Fiebre Hemorrágica Argentina.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	4
SUJETOS Y MÉTODOS	8
Sujetos	8
Determinaciones Hormonales	8
<i>FSH y LH</i>	8
<i>Testosterona</i>	9
<i>AMH</i>	9
<i>Inhibina B y Pro-αC</i>	9
Análisis Estadístico	10
RESULTADOS	10
Evolución de LH, FSH, Testosterona, AMH, Pro- α C e Inhibina B en el primer mes.....	10
Análisis apareado día 2 vs. día 7, 10, 14, 20 ó 30	12
Mujeres.....	15
Comparación de los niveles hormonales en Varones vs. Mujeres	17
CONCLUSIONES DE LOS RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN.....	19
REFERENCIAS	22

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD FUNCIONAL ENDOCRINA DEL TESTICULO EN EL PRIMER MES DE VIDA

INTRODUCCIÓN

El eje hipotálamo-hipofisario

La integración del eje hipotálamo-hipófiso-testicular en el hombre está dada por la liberación en el hipotálamo de Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH), también llamada Hormona Liberadora de Hormona Luteinizante (LHRH), que estimula a los gonodotropos de la hipófisis para secretar Hormona Luteinizante (LH) y Hormona Folículo-Estimulante (FSH). Las gonadotrofinas LH y FSH son las principales reguladoras de los dos compartimentos que presenta el testículo. La LH ejerce su acción en el compartimiento intersticial sobre la célula de Leydig para estimular la esteroidogénesis. La liberación de testosterona produce los efectos periféricos, entre los cuales se cuenta el de retroalimentación negativa sobre la LHRH y la LH. La testosterona también actúa sobre el otro compartimiento testicular –los tubos seminíferos, principalmente sobre las células de Sertoli– provocando su maduración durante la pubertad. Los andrógenos son necesarios para el desarrollo de la espermatogénesis. Su acción tiene lugar a través de la célula de Sertoli.

Por su parte, la FSH también cumple un rol de suma importancia en el mantenimiento y en el normal desarrollo de la función de las células de Sertoli y de los tubos seminíferos. En el testículo inmaduro, estimula el crecimiento testicular al regular la proliferación de las células de Sertoli, dando como resultado un aumento en la longitud del túbulo. También aumenta la producción de algunas proteínas como la AMH. En el testículo del adulto, la función de la FSH es un tema controvertido. Diferentes hechos relativizan la trascendencia de la FSH en la espermatogénesis del adulto. No obstante, los resultados publicados indican que tanto la FSH como la testosterona son esenciales para el mantenimiento de una espermatogénesis cuantitativamente normal (1).

Entre los péptidos que secreta la célula de Sertoli se encuentra la inhibina B, que es el principal regulador negativo de la secreción de FSH (2). La FSH es menos sensible que la LH al efecto de retroalimentación negativa de la testosterona. Así, si se produce una lesión que afecta sólo a los

tubos seminíferos y la concentración de testosterona permanece normal, la FSH aumenta, mientras la LH permanece invariable (3).

Inhibinas

Las Inhibinas son dos glucoproteínas heterodímeras constituidas por dos sub-unidades: una α y una β . Cada una de estas sub-unidades es sintetizada a partir un precursor progresivamente sometido a proteólisis y a glicosilación. (4). La sub-unidad α es común a todas las inhibinas; en el hombre es producto de la transcripción de un gen situado en el cromosoma 2 (región q33-qter) (5). Se sintetiza a partir de un precursor llamado Pre-pro- α N- α C cuya primer proteólisis es la transformación a Pro- α N- α C. La proteólisis sucesiva es completada según las circunstancias fisiológicas y la localización tisular en los siguientes elementos: α N- α C, α C, y Pro- α C (6). La sub-unidad β es específica de cada tipo de inhibina: A y B. La sub-unidad β A es codificada en el hombre por un gen en el cromosoma 7 (región p14-p15) y la sub-unidad β B, por un gen en el cromosoma 2 (región cen-q13) (5). La combinación de una sub-unidad α y una sub-unidad β A origina la inhibina A, mientras que la unión con una sub-unidad β B origina la inhibina B.

En el hombre, la sub-unidad α es producida por la célula de Leydig y la célula de Sertoli en las diferentes etapas del desarrollo del testículo. En cambio, la sub-unidad β B es producida por las células de Leydig y de Sertoli y por los gonocitos durante la vida fetal, solamente por las células de Sertoli durante el periodo infantil, y por las células germinales y las de Leydig en el adulto (7, 8). Entonces, la producción de inhibina B en el varón comienza durante la vida fetal y continúa aumentando hasta los 3 ó 4 meses de vida postnatal. Durante la infancia se produce un descenso gradual hasta cerca de los 5 años, con valores bajos pero siempre claramente detectables, comenzando luego a ascender lentamente; al iniciarse la pubertad, se produce un aumento más rápido hasta llegar a los valores de los adultos (9, 10).

Las Inhibinas también son sintetizadas en la mujer adulta fértil fundamentalmente por la célula de la granulosa del ovario: la Inhibina B en el periodo de transición entre la fase lútea a folicular y la Inhibina A en el folículo dominante y por las células de la granulosa luteinizadas (11, 12). Ambas Inhibinas son también sintetizadas por la placenta durante la gestación, pudiendo ser secretadas a circulación materna o a liquido amniótico dependiendo del lugar de producción, por lo que encontramos diferentes concentraciones en ambos compartimentos. En la sangre de cordón casi

no se encuentra Inhibina A, aunque sí Pro- α C, y dependiendo del sexo del feto hay Inhibina B: el origen de síntesis es el testículo fetal (9, 13, 14). Existen otras estructuras que también pueden sintetizar las Inhibinas en diferente cantidad y en diferente proporción, como ser la hipófisis, la adrenal, la médula ósea, el bazo, el riñón y el cerebro (15).

Hormona Anti-Mülleriana

Otro péptido que secretan las células de Sertoli es la Hormona Anti-Mülleriana (AMH) o Sustancia Inhibidora de los conductos de Müller (MIS). La AMH es una glucoproteína que pertenece a una súper-familia de proteínas diméricas semejantes al factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). El gen fue mapeado en el brazo corto del cromosoma 19, banda 13.3 (16, 17). La AMH ejerce su principal acción durante la vida fetal en el sexo masculino, siendo responsable de la regresión de los conductos de Müller, que son los esbozos de las trompas de Falopio, el útero y la parte superior de la vagina. La expresión de la AMH comienza en la séptima semana del desarrollo embrionario, y se mantiene elevada durante la infancia. Al comienzo de la pubertad, inicia un marcado descenso para llegar a la adultez con valores muy bajos o indetectables en plasma (18). Si bien varios autores han propuesto que existe una disminución de la secreción de AMH al final de la gestación (19, 20), existen muy pocos datos con respecto a los niveles circulantes de la AMH en el periodo neonatal.

La AMH también es producida en el ovario, aunque en mucho menor cantidad. Las células de la granulosa expresan AMH desde el último trimestre de la vida fetal hasta la menopausia. En el desarrollo fetal temprano, los folículos primordiales no secretan AMH. Hacia el final de la gestación, producen AMH desde el folículo primario al preantral; en el folículo pre-ovulatorio la síntesis de AMH está restringida principalmente a las células del cumulus (21, 22).

Testosterona

En la zona intersticial del testículo, la célula de Leydig produce testosterona. La secreción comienza en la octava semana de vida intrauterina, estimulada por la gonadotropina coriónica humana (hCG). Luego de la mitad de la gestación, la LH fetal mantiene elevada la producción de testosterona. Los niveles de testosterona están altos en el varón en las primeras 12 horas luego del nacimiento (23). Luego se ha descrito una disminución seguida de un nuevo ascenso, en respuesta a la activación de la LH, que perdura hasta los 3 a 6 meses de vida (24-26). La cronología precisa de estos cambios en el primer mes de vida no ha sido estudiada en detalle.

Posteriormente, durante la niñez, los niveles de LH y testosterona descienden hasta ser indetectables. En el comienzo de la pubertad encontramos un ascenso en el perfil sérico de testosterona que alcanza, al finalizar el desarrollo puberal, los valores del adulto.

Utilidad de los dosajes hormonales y Problema

En niños recién nacidos con genitales masculinos correctamente desarrollados o con genitales ambiguos, podemos encontrar que los testículos no son palpables en las bolsas escrotales. Se debe distinguir en estos casos entre una falta total de testículos y la presencia de tejido testicular en la cavidad abdominal. Las causas pueden ser primariamente testiculares, o secundarias a un defecto del eje hipotálamo-hipofisario. En ambos casos es menester identificar la existencia y capacidad funcional de los testículos.

Entre los métodos diagnósticos existentes para definir la existencia de gónadas, contamos la exploración quirúrgica, que provee un diagnóstico definitivo, si bien las gónadas pueden ser difíciles de encontrar. Es una exploración invasiva y puede ocasionar un compromiso en el tejido gonadal. Los métodos de diagnóstico por imágenes son pocos sensibles, con excepción de la resonancia magnética nuclear (RMN), que en el niño debe ser realizada bajo anestesia. Las mediciones en sangre de las hormonas del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal son más adecuadas para definir la presencia y capacidad funcional del tejido testicular. Esto ha sido demostrado en muchos trabajos en la niñez. Sin embargo no existen en la literatura trabajos sistemáticos que definan con precisión el patrón de cambio de los valores normales de las hormonas del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal en el período neonatal.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo ha sido describir los cambios que ocurren en los valores de LH, FSH, Testosterona, AMH, Inhibina B y Pro- α C dentro del primer mes de vida en varones normales. Como medida comparativa, se midieron los valores de las mismas hormonas en niñas recién nacidas y de 1 mes de vida.

SUJETOS Y MÉTODOS

Sujetos

Se obtuvo una alícuota de sangre de las extracciones realizadas en el marco del programa de pesquisa de los errores congénitos del metabolismo en 64 niños nacidos sanos y de término en el Hospital de Agudos de la Ciudad de Junín y en la Clínica Médico Quirúrgica Sanatorio Junín entre marzo y mayo de 2002. Luego se tomó una segunda muestra, aproximadamente a los 7, 10, 14, 20, ó 30 días de vida. Por lo tanto para cada uno de los individuos, se obtuvieron dos muestras, una en el segundo día de vida y la otra en alguno de los días antes mencionados. De una manera semejante se procedió con 13 niñas pero la segunda muestra solo se obtuvo a los 30 días de vida aproximadamente.

Luego de la revisión clínica de rutina, se realizó la toma de las muestras de sangre en los niños varones sanos con testículos palpables a los 2 días de vida. Por rutina tanto en el servicio de neonatología del Hospital de Agudos de la Ciudad de Junín como en la Clínica Sanatorio Junín, la toma de muestra para estudio de los errores congénitos del metabolismo se realizan por punción de vena de la cara dorsal de la mano o de la muñeca. Se centrifugaron las muestras para obtener el suero, que se conservó a -20° C hasta el momento de la realización de las determinaciones. En todos los casos se incluyeron en el estudio las muestras provenientes de niños cuyos padres aceptaron previa explicación y firmaron el correspondiente consentimiento informado.

Determinaciones Hormonales

FSH y LH

Las determinaciones de FSH y LH fueron resueltas por un método inmuno-fluorométrico (DELFA, Wallac, inc., Turku, Finland) en las condiciones originales de las metodologías. Para la FSH el límite de detección mínima del ensayo fue de 0,10 UI/l, como estándar se usó la segunda preparación de la referencia internacional de la hipófisis 78/549 de la Organización Mundial de la Salud. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron respectivamente menores a 1,8 y 7,6% para cualquier dosis en el rango de 3,8 – 26,8 UI/l (27). En el caso de la LH, el límite de detección mínima del ensayo fue de 0,05 UI/l, como estándar se usó la

preparación 68/40 de referencia internacional de la Organización Mundial de la Salud. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 2,2 y 9,5% respectivamente para cualquier dosis en el rango 3,8 – 39.4 UI/l.

Testosterona

La testosterona en suero fue medida por radio inmuno ensayo (RIA) usando un equipo comercial (Diagnostic System Laboratories, Webster, TX, EEUU) en las condiciones originales de la metodología, con un límite de detección de 10 ng/dl. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron menores al 12 %. Cada muestra fue separada en 2 alícuotas, una de las cuales fue sometida a extracción mediante éter etílico (24).

AMH

La AMH del suero fue medida por un enzimo-inmunoensayo comercial AMH/MIS ELISA (Immunotech – Beckman, Marsella, Francia). Es un ensayo inmuno-enzimático tipo sándwich con dos pasos inmunológicos. En la primer etapa, la AMH de los pacientes o de los estándares es capturada por el anticuerpo monoclonal anti-AMH unido a la fase sólida, la microplaca. En el segundo paso, se le agrega un segundo anticuerpo monoclonal anti-AMH biotilado y a continuación se agrega el conjugado de estreptavidina–peroxidasa. Después de agregar el sustrato de TMB, el color resultante es medido en un espectrofotómetro a 450 nm (28). Para construir la curva estándar, se usó una preparación de AMH recombinante humana. El límite de detección del ensayo fue de 0,7 pmol/l (0,1 ng/ml) y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 5,3 % y 8,7 % respectivamente, para una concentración en suero de 35 pmol/l, y de 4,9 % y 7,8 % para una concentración en suero de 1100 pmol/l. No fue observada reacción cruzada con el TGF- β (28).

Inhibina B y Pro- α C

La Inhibina B y la Pro- α C fueron medidas usando enzimo-inmunoensayos comerciales (Oxford Bio-Innovation Ltd, Oxon, Inglaterra) específicos para cada péptido descritos previamente (10, 29). Los estándares usados fueron Inhibina B recombinante (Genetech, San Francisco, CA, EEUU) y una preparación parcialmente purificada (mayor del 75 % de pureza) de Pro- α C. La sensibilidad del ensayo para la Inhibina B fue de 15 pg/ml y para la Pro- α C, de 2 pg/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron cercanos al 10 % para ambos ensayos.

Análisis Estadístico

Los valores fueron expresados como medias \pm el error estándar. Según los casos, se aplicaron las siguientes pruebas estadísticas: análisis de varianza de una-vía (ANOVA) con test de Bartlett para varianzas iguales, test de t de 1 muestra, test de t apareado, test para comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, y test de t no apareado con corrección de Welch. Para todos los análisis estadísticos se usó el software GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU).

RESULTADOS

Evolución de LH, FSH, Testosterona, AMH, Pro- α C e Inhibina B en el primer mes

En la figura N° 1, se graficaron todos los valores de cada hormona observados en varones a lo largo del primer mes de vida.

La LH (Figura 1 A), en el día 2, dio valores muy bajos: de 52 pacientes, fue no dosable en 18, siendo el valor máximo de 1,10 UI/L. En los días sucesivos, todos los valores fueron dosables, si bien en algunos casos fueron todavía bajos (por ejemplo, 0,15 UI/l y 0,08 UI/l en el día 7 y 8 respectivamente). El valor máximo observado fue de 9,60 UI/L en el día 12.

La FSH (Figura 1 B) presentó una distribución semejante, con 18 valores no dosables y un máximo de 1,30 UI/L en el día 2. Luego, en los días sucesivos, los valores variaron de no dosable (sólo un caso en el día 7) a un máximo de 6,90 UI/L el día 14.

Cabe aclarar que solamente en 12 casos, ambas gonadotrofinas fueron no dosables en el mismo individuo, en tanto que 6 casos tuvieron FSH no dosable con LH dosable y otros 6, viceversa.

La testosterona en muestras extraídas (Figura 1 C) dio un valor mínimo de 18 ng/dl y un máximo de 212 ng/dl en el día 2. En días subsiguientes, los valores se mantuvieron estables, incrementándose hacia los últimos días del primer mes, con un valor máximo observado de 508 ng/dl.

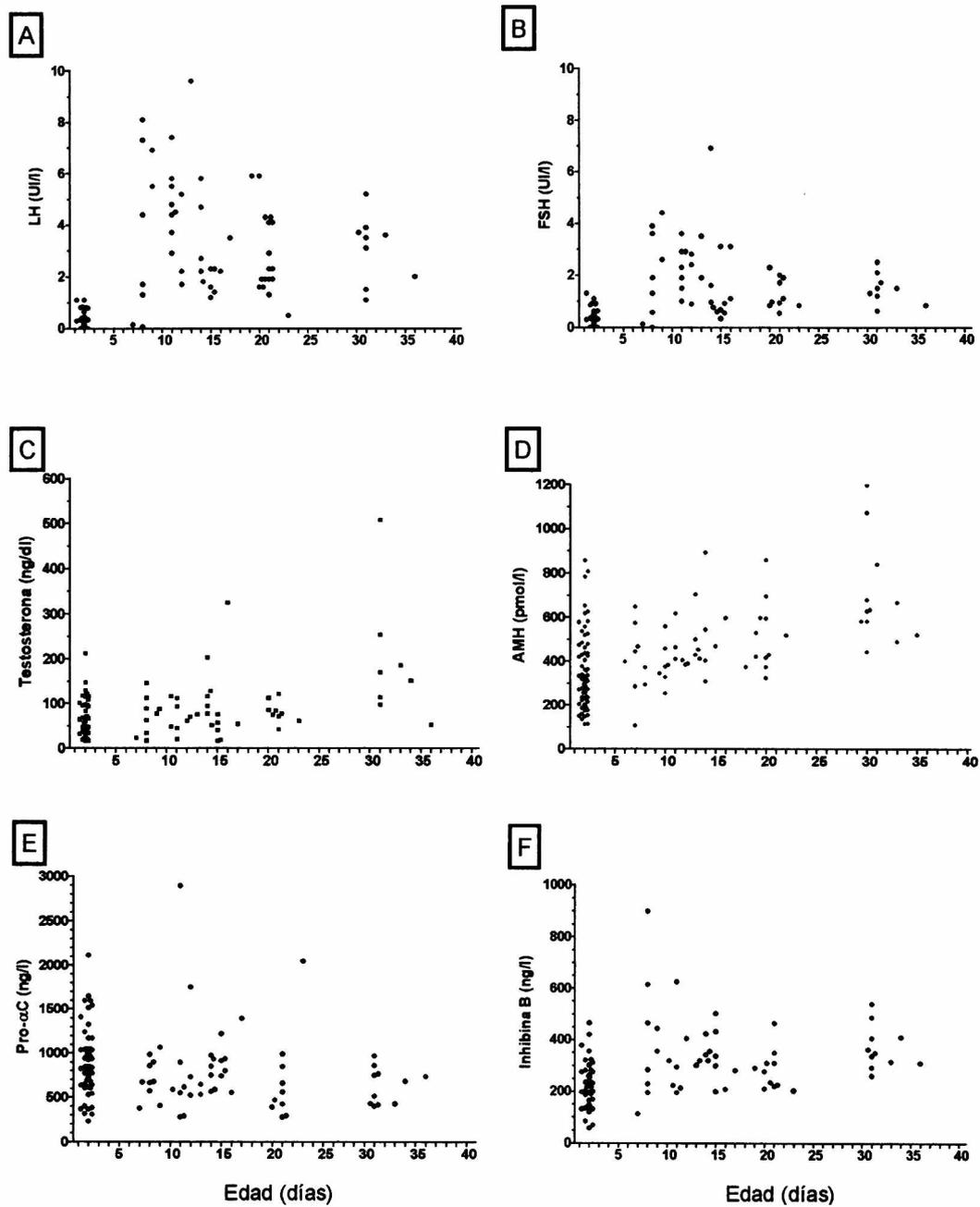


Figura 1. Niveles hormonales a lo largo del primer mes de vida en varones normales.

La AMH (Figura 1 D) mostró valores entre 114 y 856 pmol/L en el día 2, con un aumento a lo largo de los días llegando a valores de 1197 pmol/L en el día 30.

Los valores de Pro- α C (Figura 1 E) se encontraron entre 230 y 2112 ng/l en el día 2, manteniéndose relativamente estables a lo largo de los 30 días con una disminución de la dispersión de los mismos.

La Inhibina B (Figura 1 F) osciló en el día 2 entre 57 y 465 ng/l. Durante el primer mes los valores ascendieron lentamente, disminuyendo la dispersión, llegando a un mínimo de 248 ng/l y un máximo de 540 ng/l en el día 30.

Análisis apareado día 2 vs. día 7, 10, 14, 20 ó 30

Para el análisis estadístico de los resultados, los valores fueron agrupados por edad. La primera muestra fue tomada en todos los casos en el segundo día de vida. La segunda toma de muestra no siempre se pudo realizar en el día prefijado, agrupándose de la siguiente manera:

Grupo día 7: 6 días de vida (n=1), 7 días (n=6) y 8 días (n=2);

Grupo día 10: 10 días de vida (n=7), 11 días (n=3) y 12 días (n=3);

Grupo día 14: 13 días de vida (n=4), 14 días (n=5), 15 días (n=1) y 16 días (n=1);

Grupo día 20: 18 días de vida (n=1), 19 días (n=2), 20 días (n=8) y 22 días (n=1);

Grupo día 30: 30 días de vida (n=8), 31 días (n=1), 33 días (n=2) y 35 días (n=1).

En primera instancia, se realizó un análisis de normalidad de los datos. Los valores hormonales mostraron una distribución normal en todos los casos excepto para FSH y LH en el día 2, conformado en su mayoría por valores muy bajos o no dosables.

Luego, para cada hormona, se realizó un análisis apareado en cada individuo de los valores observados en la primera muestra (día 2) y en la segunda (día 7, 10, 14, 20 o 30, Figura 2). Para asegurarnos que dicho análisis fuera válido, primero se calcularon las medias correspondientes al día 2 de los 5 subgrupos. El análisis de varianza (ANOVA) no mostró diferencias significativas entre las ellas.

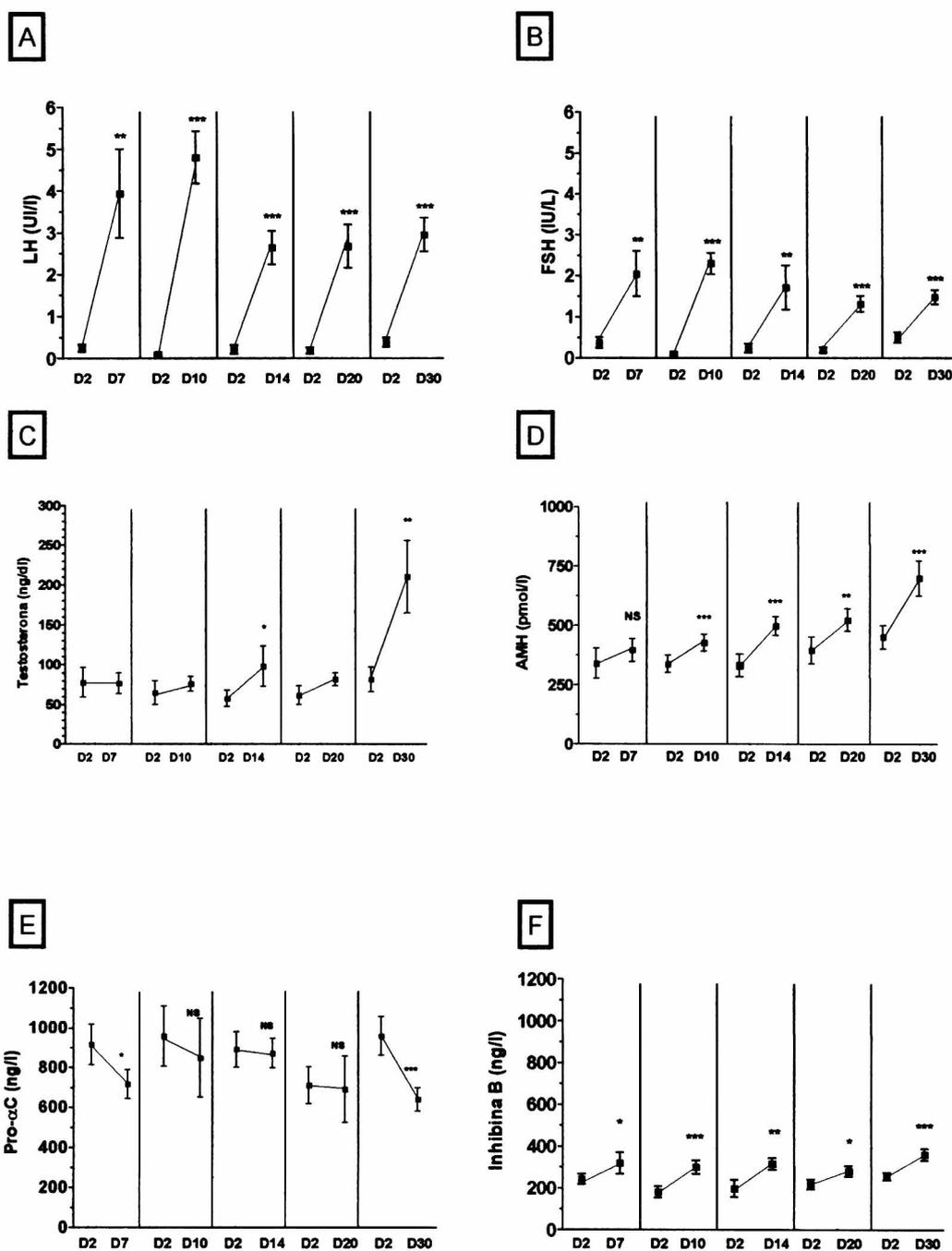


Figura 2. Estudio semi-longitudinal de los valores hormonales medios en varones normales. En cada grupo, la primera muestra se tomó en el día 2 de vida y la segunda muestra se tomó en el día 7, 10, 14, 20 o 30. En primera instancia se compararon los valores medios del día 2 de todos los grupos por ANOVA de 1 vía. Luego se realizó un análisis apareado (test de t apareado) de los valores observados en la primera muestra (día 2) y en la segunda (día 7, 10, 14, 20 o 30).

La media de LH (Figura 2 A) en el día 2 fue de $0,21 \pm 0,04$ UI/l, siendo significativamente más elevada en los días 7 ($3,93 \pm 1,06$ UI/l), 10 ($4,80 \pm 0,63$ UI/l), 14 ($2,64 \pm 0,40$ UI/l), 20 ($2,67 \pm 0,51$ UI/l) y 30 ($2,95 \pm 0,40$ UI/l).

Para la FSH (Figura 2 B), la media en el día 2 fue de $0,25 \pm 0,04$ UI/l, también presentando un aumento en los días 7 ($2,04 \pm 0,55$ UI/l), 10 ($2,29 \pm 0,25$ UI/l), 14 ($1,71 \pm 0,54$ UI/l), 20 ($1,31 \pm 0,19$ UI/l) y 30 ($1,48 \pm 0,17$ UI/l).

El cociente de LH/FSH en varones (Figura 3) mostró un predominio de LH en casi todas las edades, exceptuando el día 2 que dio un valor cercano a 1.

En muestras extraídas, la Testosterona media (Figura 2 C) fue de 65 ± 6 ng/dl en el día 2. No se observaron cambios significativos a los días 7 (76 ± 13 ng/dl) y 10 (76 ± 9 ng/dl); en cambio hubo un aumento al día 14 (98 ± 25 ng/dl). A los 30 días, los niveles de Testosterona fueron los más elevados (210 ± 46 ng/dl). En las alícuotas no extraídas de las mismas muestras (resultados no graficados), los niveles de Testosterona fueron sobrevalorados en los primeros 14 días, según se observa a continuación: día 2 = 216 ± 11 ng/dl, día 7 = 163 ± 14 ng/dl, día 10 = 164 ± 9 ng/dl, pero no a los 30 días (147 ± 12 ng/dl).

Para la AMH (Figura 2 D), la media de todos los valores en el día 2 fue de 371 ± 22 pmol/l. No hubo cambios significativos en el día 7 (397 ± 48 pmol/l). En cambio se observó un aumento significativo a partir del día 10 (427 ± 35 pmol/l). Los días 14 (498 ± 40 pmol/l), 20 (523 ± 47 pmol/l) y 30 (699 ± 74 pmol/l) también mostraron valores significativamente mayores a los del día 2.

Para la Pro- α C (Figura 2 E), la media del día 2 fue de 916 ± 103 ng/l. Comparando las muestras subsiguientes, si bien se observa una ligera disminución en el día 7 (716 ± 73 ng/l), esta no se mantiene a lo largo de los días 10 (848 ± 198 ng/l), 15 (872 ± 73 ng/l) y 20 (692 ± 167 ng/l). En el día 30 (641 ± 58 ng/l) se observa nuevamente una ligera disminución.

Para la Inhibina B (Figura 2 F), la media de los valores en el día 2 fue de 241 ± 25 ng/l. Comparando con el día 2, se observó un aumento significativo en los días 7 (318 ± 53 ng/l), 10 (299 ± 33 ng/l), 15 (316 ± 27 ng/l), 20 (280 ± 26 ng/l) y 30 (360 ± 28 ng/L).

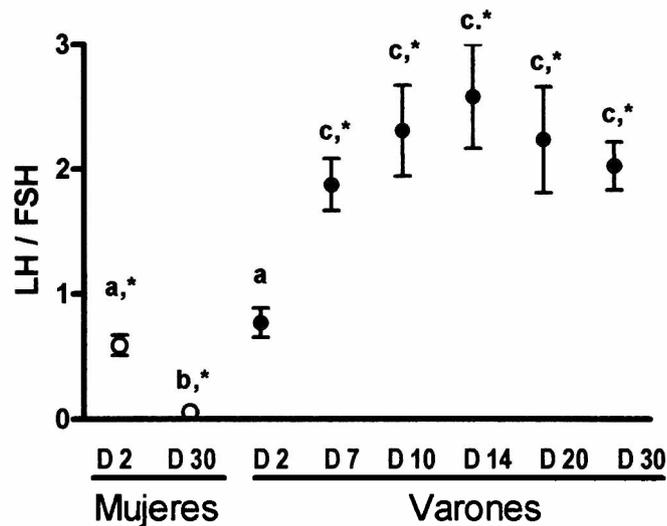


Figura 3. Cociente LH/FSH en mujeres de 2 y 30 días de vida y en varones de 2, 7, 10, 14, 20 y 30 días de vida. Test para comparaciones múltiples de Tukey-Kramer: las letras diferentes indican diferencias significativas. Test de t de 1 muestra contra una media teórica de 1: los asteriscos indican una diferencia significativa con el valor teórico de LH/FSH = 1.

Mujeres

En el caso de las mujeres, se estudiaron 13 niñas recién nacidas sanas (día 2) y se realizaron las mismas determinaciones hormonales en el día 30 (Figura 4).

La LH, en el día 2 dio valores muy bajos: 8 de 13 muestras fueron no dosables y el valor máximo fue de 0,45 UI/l, con una media de $0,09 \pm 0,03$ UI/l. En el día 30, la LH fue no dosable en 4 casos de 13, siendo el valor máximo de 1,90 UI/l y la media de $0,49 \pm 0,18$ UI/l. La diferencia entre día 2 y 30 fue estadísticamente significativa.

La FSH en el día 2 también mostró niveles bajos, con 8 valores no dosables y un máximo de 0,64 UI/l y una media de $0,17 \pm 0,04$ UI/l. En el día 30, todas las muestras presentaron valores detectables, con un mínimo 0,63 UI/l, un máximo de 21,50 UI/l y una media de $6,65 \pm 1,94$ UI/l. La diferencia observada entre el día 2 y el día 30 fue significativa.

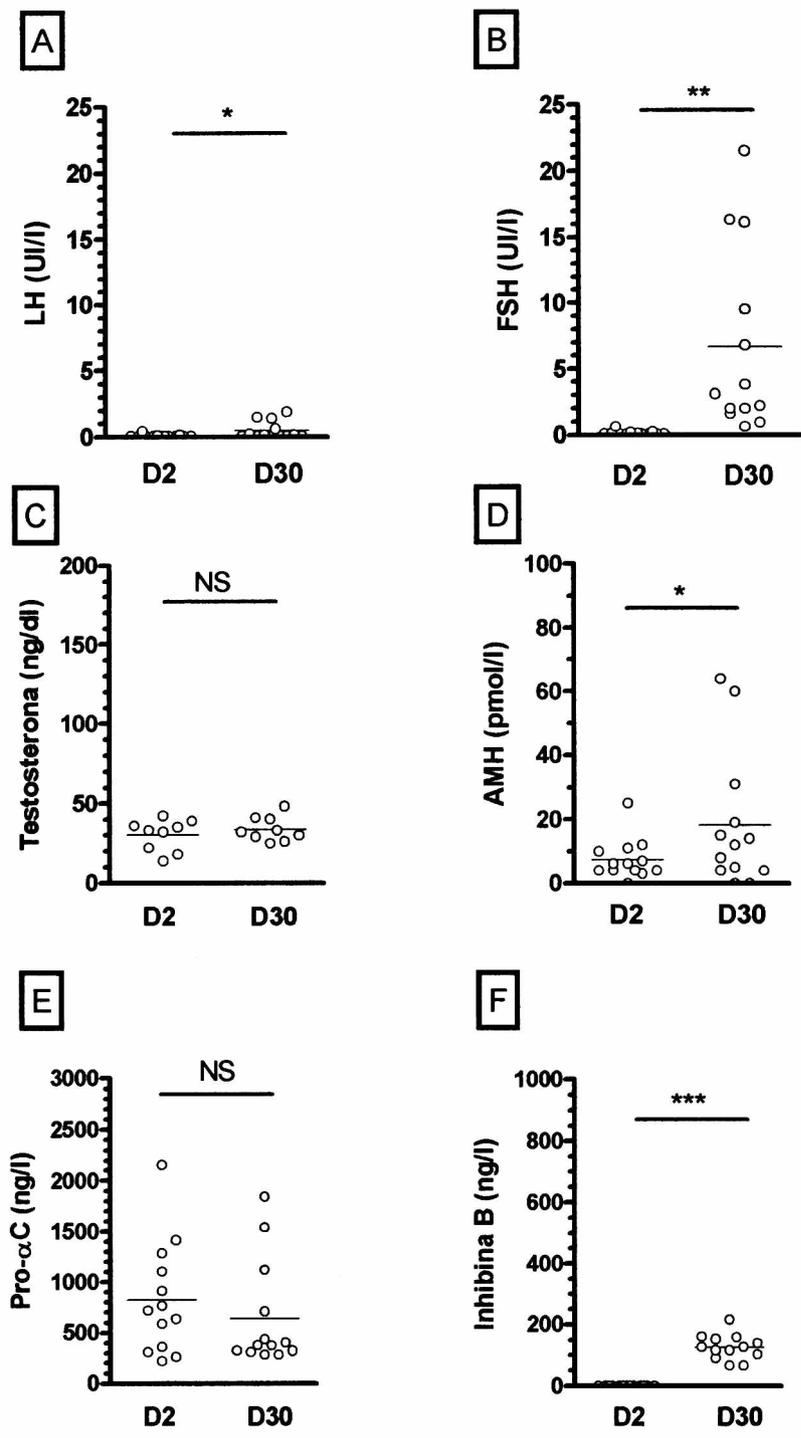


Figura 4. Niveles hormonales en mujeres de 2 y 30 días de vida. Análisis apareado (test de t apareado) de los valores observados en la primera muestra (día 2) y en la segunda (día 30).

El cociente LH/FSH mostró un neto predominio de FSH (Figura 3), por lo cual los valores fueron < 1 tanto a los 2 días ($0,59 \pm 0,08$) como a los 30 días ($0,06 \pm 0,01$).

En muestras extraídas, a los 2 días de vida la testosterona dio valores de 14 a 42 ng/dl, con una media de 30 ± 3 ng/dl. A los 30 días, los valores no fueron significativamente diferentes: de 25 a 48 ng/dl, con una media de 33 ± 2 ng/dl. Al igual que para los varones, en las alícuotas no extraídas de las niñas, la Testosterona fue sobrevalorada en las recién nacidas: a los 2 días el valor fue de 139 ± 5 ng/dl y a los 30 días, de 40 ± 7 ng/dl (resultados no graficados).

La AMH en el día 2 fue de no detectable (1 caso) a 25 pmol/l, con una media de $7,38 \pm 1,75$ pmol/l. En el día 30, el rango osciló entre no detectable (1 caso) a 64 pmol/l, con una media de $18,15 \pm 5,89$ pmol/l. A pesar de la superposición, las medias fueron significativamente diferentes.

La Pro- α C mostró en el día 2 un valor mínimo de 222 ng/l y un máximo de 2155 ng/l, con una media de 826 ± 153 ng/l. En el día 30, el valor mínimo fue de 284 ng/l y el máximo, de 1842 ng/l, con una media de 641 ± 145 ng/L. No hubo diferencias significativas.

La inhibina B fue no detectable en todas las muestras del día 2, mientras que en el día 30 los valores ascendieron a un mínimo de 65 ng/l y un máximo de 215 ng/l, con una media de 125 ± 11 ng/l.

Comparación de los niveles hormonales en Varones vs. Mujeres

Como se observa en la Tabla 1, la LH fue significativamente más alta en varones que en mujeres a los 2 y 30 días de vida. La FSH fue levemente más alta en varones a los 2 días, pero luego fue más elevada en mujeres a los 30 días. La Testosterona, la AMH y la Inhibina B fueron siempre más altas en varones, mientras que la Pro- α C no mostró diferencias entre los sexos.

Tabla 1. Valores hormonales séricos (media \pm ES) en varones y mujeres recién nacidos (1 día y 30 días de vida)

	Varones	Mujeres	p	
LH (UI/l)				
2 días	0,21 \pm 0,04	0,09 \pm 0,03	0,0290	*
30 días	2,95 \pm 0,40	0,49 \pm 0,18	< 0,0001	***
FSH (UI/l)				
2 días	0,25 \pm 0,04	0,17 \pm 0,04	0,0305	*
30 días	1,48 \pm 0,17	6,65 \pm 1,94	0,0211	*
Testosterona (ng/dl)				
2 días	65 \pm 6	30 \pm 3	0,0031	**
30 días	210 \pm 46	33 \pm 2	< 0,0001	***
AMH (pmol/l)				
2 días	371 \pm 22	7,3 \pm 1,7	< 0,0001	***
30 días	699 \pm 74	18,2 \pm 5,9	< 0,0001	***
Pro-αC (ng/l)				
2 días	916 \pm 103	826 \pm 153	0,4730	NS
30 días	641 \pm 58	641 \pm 145	0,9991	NS
Inhibina B (ng/l)				
2 días	241 \pm 25	ND		
30 días	360 \pm 28	125 \pm 11	0,0054	**

Varones vs. Mujeres, t test no apareado con corrección de Welch.

NS: no significativo

ND: no detectable

CONCLUSIONES DE LOS RESULTADOS

Las principales conclusiones de nuestro estudio son:

- 1) la actividad hipófiso-gonadal está en su nivel más bajo en el 2° día de vida, según lo reflejan los valores de gonadotrofinas y hormonas testiculares y ováricas;
- 2) en varones, la actividad hipofisaria aumenta significativamente en la primera semana de vida y se mantiene estable durante el primer mes, en base a los niveles de LH y FSH;
- 3) los marcadores sertolianos (AMH e Inhibina B) aumentan significativamente hasta los 7 y 10 días de vida, para luego estabilizarse o aumentar muy levemente;
- 4) la función leydigiana (testosterona) aumenta discretamente a partir del día 14, siendo su cambio más marcado entre los 20 y 30 días de vida;
- 5) los niveles de LH y FSH son similares en el varón en el 2° día de vida; lo mismo puede decirse para las mujeres. En cambio, al mes de vida, los niveles de LH son más altos que los de FSH en el varón, ocurriendo lo inverso en la mujer;
- 6) en el 2° día de vida, el valor medio de testosterona es levemente superior en varones que en mujeres, pero existe superposición; en cambio, la diferencia es significativa, y sin superposición, al final del primer mes;
- 7) los marcadores sertolianos, AMH e inhibina B, son siempre significativamente más elevados en varones que en mujeres durante el primer mes de vida.

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que informa en detalle el patrón de variación en suero de las gonadotrofinas y los marcadores testiculares de las células de Sertoli y Leydig en varones a lo largo del primer mes de vida. Los estudios previos habían explorado parcialmente alguno de estos componentes del eje hipófiso-gonadal durante los primeros días de vida o a lo largo de un tiempos más prolongados con menos detalle de lo que ocurre en las primeras semanas de vida.

Corbier y col. (23) informan de las diferencias en las gonadotrofinas de acuerdo al sexo en las primeras horas de vida. Shinkawa y col. (30) y Schmidt y Schwarz (31) describen las diferencias sexuales de las gonadotrofinas en recién nacidos. Todos estos estudios fueron hechos por métodos de radioinmunoensayo. En nuestro caso usamos un método ultra-sensible inmunofluorométrico que nos permite medir valores muy bajos de gonadotrofinas y hacer, de esa manera, comparaciones más precisas entre las edades y entre los sexos. Recientemente Chada y col. (32, 33) informan el rango de gonadotrofinas usando un método sensible (inmunoquimioluminiscente), pero agrupan sin distinguir niños de 1 semana a 2 meses de vida. A pesar de las diferencias metodológicas señaladas, la mayoría de los resultados, incluidos los nuestros, indican que la actividad gonadotrófica cae en los primeros días luego del nacimiento para volver a aumentar progresivamente hacia fines de la primera semana. La LH es la gonadotrofina predominante en el varón, siendo la FSH en la mujer, ya desde los 7 días de vida.

La testosterona ha sido la hormona testicular más clásicamente estudiada hasta recientemente. Corbier y col. (23), en un estudio en las primeras 24 hs posteriores al nacimiento, muestran un incremento de la testosterona en niños entre las 3 y las 12 horas posteriores al nacimiento. En este estudio, demostramos que dicho pico de testosterona ya no se encuentra en el 2° día de vida y, en concordancia con lo publicado por Forest y col. (25, 26), que los andrógenos testiculares se incrementan nuevamente a partir de la segunda mitad del primer mes de vida. Dado que los valores de testosterona son bajos en varones en los primeros 15 días y en las mujeres durante todo el primer mes, es indispensable utilizar métodos extractivos para evitar valores falsamente elevados, tal como la habían señalado varios autores (25, 26, 34) y como lo muestran nuestros resultados usando el mismo ensayo para comparar las mismas muestras sometidas o no a método extractivo.

La aparición en años más recientes de ensayos específicos para la determinación de AMH (28) y de inhibina B (29) ha permitido realizar una evaluación más completa de la función testicular endocrina, al extender el estudio al sector tubular donde se encuentran las células de Sertoli. No existía hasta el presente un análisis detallado de la evolución de la función sertoliana en el primer mes de vida usando ensayos comercialmente disponibles. Los valores de AMH de este estudio concuerdan con los datos de Lee y col. (35), quienes usaron un ELISA solamente disponible en un laboratorio de Boston. Las coincidencias de ambos estudios prueban que la AMH aumenta

progresivamente durante el primer mes de vida en el varón. Por otra parte, siempre los niveles de AMH son más elevados en el varón que en la mujer.

Tampoco existía hasta el momento ningún estudio de la evolución de la inhibina B durante el primer mes de vida. Algunos estudios habían mostrado altos niveles de Inhibina B en suero de sangre de cordón de varones contra valores indetectables en mujeres, lo que indica un claro origen testicular del péptido (9, 14, 36-39). La inhibina B es claramente dimórfica sexualmente en el feto y el recién nacido: nuestro estudio confirma que sólo el testículo la produce al nacer, siendo los niveles de dicho péptido indetectables en las niñas al 2º día de vida. En concordancia con lo observado por otros autores, que compararon los niveles circulantes de inhibina B al nacimiento y a los 3-4 meses (36, 37), nosotros hemos puesto en evidencia que el testículo aumenta su secreción de dicho péptido en la primera semana de vida. También mostramos que el ovario comienza a secretar inhibina B en el primer mes, pero los niveles circulantes en la niña persisten significativamente por debajo del de los varones.

El precursor de la subunidad α , Pro- α C, no parece ser un indicador exclusivo de la función gonadal ni ser de utilidad como marcador del dimorfismo sexual. Nosotros encontramos valores elevados de Pro- α C en ambos sexos durante todo el primer mes de vida. Esto concuerda con los informes de Riley y col. (40), que muestran que la Pro- α C está alta en circulación fetal sin patrón de diferencia entre ambos sexos. Los valores fetales son aproximadamente 3 veces más altos que los observados por nosotros en el día 2 de vida. Trabajos previos muestran que la Pro- α C declina durante la infancia (10), lo cual asociado a un aumento de la inhibina B, hace que el cociente Inhibina B/Pro- α C sea cercano a 1 en el varón.

En resumen, nuestros resultados en conjunto con los de trabajos anteriores proveen información precisa sobre la evolución de los valores hormonales séricos del eje hipófiso-gonadal masculino en el primer mes de vida. La alta sensibilidad y especificidad de los ensayos permiten analizar la evolución funcional de las diferentes poblaciones celulares. La suma de resultados permite armar el conocimiento de la dinámica del eje: las gonadotrofinas y la testosterona están altas en las primeras horas posteriores al nacimiento y descienden bruscamente hacia el 2º día de vida. Las gonadotrofinas y las hormonas sertolianas –AMH e inhibina B- aumentan sus niveles circulantes en la primera semana de vida para estabilizarse luego, en tanto que la testosterona –que refleja la función leydigiana- aumenta más lentamente, hacia el final del primer mes. Desde un punto de vista diagnóstico, los marcadores de las células de Sertoli son los indicadores funcionales más

útiles de la existencia de tejido testicular en el recién nacido, en tanto que el aumento de la testosterona y una relación LH/FSH en favor de la primera se constituyen en marcadores del dimorfismo hipófiso-testicular con el transcurso de las primeras semanas de vida. Estas herramientas diagnósticas permiten resolver con gran precisión un obstáculo en el proceso de diagnóstico en el recién nacido con gónadas no palpables o con alguna anomalía de la diferenciación sexual, en un momento en que es necesario minimizar la ansiedad de la familia del niño.

REFERENCIAS

1. **McLachlan RI** 2000 The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 14:345-362
2. **Burger HG**. 2001 Gonadal peptides: inhibins, activins, follistatin, müllerian-inhibiting substance (antimüllerian hormone). In: De Groot LJ, Jameson JL, eds. *Endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders; 1905-1915.
3. **Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E** 2004 Klinefelter's syndrome. *Lancet* 364:273-283
4. **Mason AJ, Farnworth PG, Sullivan J** 1996 Characterization and determination of the biological activities of noncleavable high molecular weight forms of inhibin A and activin A. *Mol Endocrinol* 10:1055-1065
5. **Barton DE, Yang-Feng TL, Mason AJ, Seeburg PH, Francke U** 1989 Mapping of genes for inhibin subunits alpha, beta A, and beta B on human and mouse chromosomes and studies of jsd mice. *Genomics* 5:91-99
6. **Good TE, Weber PS, Ireland JL, Pulaski J, Padmanabhan V, Schneyer AL, Messerlian G, Ghosh BR, Miller WL, Groome N** 1995 Isolation of nine different biologically and immunologically active molecular variants of bovine follicular inhibin. *Biol Reprod* 53:1478-1488
7. **Andersson AM, Müller J, Skakkebaek NE** 1998 Different roles of prepubertal and postpubertal germ cells and Sertoli cells in the regulation of serum inhibin B levels. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4451-4458
8. **Marchetti C, Hamdane M, Mitchell V, Mayo K, Devisme L, Rigot JM, Beauvillain JC, Hermand E, Defossez A** 2003 Immunolocalization of Inhibin and Activin {alpha} and {beta}B Subunits and Expression of Corresponding Messenger RNAs in the Human Adult Testis. *Biol Reprod* 68:230-235

9. **Andersson AM, Toppari J, Haavisto AM, Petersen JH, Simell T, Simell O, Skakkebaek NE** 1998 Longitudinal Reproductive Hormone Profiles in Infants: Peak of Inhibin B Levels in Infant Boys Exceeds Levels in Adult Men. *J Clin Endocrinol Metab* 83:675-681
10. **Bergadá I, Rojas G, Ropelato MG, Ayuso S, Bergadá C, Campo S** 1999 Sexual dimorphism in circulating monomeric and dimeric inhibins in normal boys and girls from birth to puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)* 51:455-460
11. **Sehested A, Juul AA, Andersson AM, Petersen JH, Jensen TK, Müller J, Skakkebaek NE** 2000 Serum inhibin A and inhibin B in healthy prepubertal, pubertal, and adolescent girls and adult women: relation to age, stage of puberty, menstrual cycle, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1634-1640
12. **de Kretser DM, Hedger MP, Loveland KL, Phillips DJ** 2002 Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update* 8:529-541
13. **Anderson RA, Cambray N, Hartley PS, McNeilly AS** 2002 Expression and localization of inhibin alpha, inhibin/activin betaA and betaB and the activin type II and inhibin beta-glycan receptors in the developing human testis. *Reproduction* 123:779-788
14. **Riley SC, Leask R, Balfour C, Brennan JE, Groome NP** 2000 Production of inhibin forms by the fetal membranes, decidua, placenta and fetus at parturition. *Hum Reprod* 15:578-583
15. **Meunier H, Rivier C, Evans RM, Vale W** 1988 Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:247-251
16. **Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP** 1986 Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45:685-698
17. **Cohen Haguenaer O, Picard JY, Mattei MG, Serero S, Nguyen VC, de Tand MF, Guerrier D, Hors Cayla MC, Josso N, Frézal J** 1987 Mapping of the gene for anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 44:2-6
18. **Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarrás P** 2003 AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol* 211:21-31
19. **Josso N, Lamarre I, Picard JY, Berta P, Davies N, Morichon N, Peschanski M, Jeny R** 1993 Anti-Müllerian hormone in early human development. *Early Hum Dev* 33:91-99
20. **Guibourdenche J, Lucidarme N, Chevenne D, Rigal O, Nicolas M, Luton D, Leger J, Porquet D, Noel M** 2003 Anti-Müllerian hormone levels in serum from human fetuses and children: pattern and clinical interest. *Mol Cell Endocrinol* 211:55-63
21. **Long WQ, Ranchin V, Pautier P, Belville C, Denizot P, Cailla H, Lhommé C, Picard JY, Bidart JM, Rey R** 2000 Detection of minimal levels of serum anti-Müllerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab* 85:540-544

22. **Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N, Græm N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek NE** 1999 Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3836-3844
23. **Corbier P, Dehennin L, Castanier M, Mebazaa A, Edwards DA, Roffi J** 1990 Sex differences in serum luteinizing hormone and testosterone in the human neonate during the first few hours after birth. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1344-1348
24. **Forest MG, Sizonenko PC, Cathiard AM, Bertrand J** 1974 Hypophyso-gonadal function in humans during the first year of life. 1. Evidence for testicular activity in early infancy. *J Clin Invest* 53:819-828
25. **Forest MG, Cathiard AM** 1975 Pattern of plasma testosterone and delta4-androstenedione in normal newborns: Evidence for testicular activity at birth. *J Clin Endocrinol Metab* 41:977-980
26. **Forest MG, Cathiard AM, Bertrand JA** 1973 Evidence of testicular activity in early infancy. *J Clin Endocrinol Metab* 37:148-151
27. **Ropelato MG, Escobar ME, Gottlieb S, Bergadá C** 1997 Gonadotropin secretion in prepubertal normal and agonadal children evaluated by ultrasensitive time-resolved immunofluorometric assays. *Horm Res* 48:164-172
28. **Rey RA, Belville C, Nihoul-Fékété C, Michel-Calemard L, Forest MG, Lahlou N, Jaubert F, Mowszowicz I, David M, Saka N, Bouvattier C, Bertrand AM, Lecointre C, Soskin S, Cabrol S, Crosnier H, Léger J, Lortat-Jacob S, Nicolino M, Rabl W, Toledo SP, Bas F, Gompel A, Czernichow P, Josso N** 1999 Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimüllerian hormone measurement. *J Clin Endocrinol Metab* 84:627-631
29. **Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNeilly AS, Bremner WJ** 1996 Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3341-3345
30. **Shinkawa O, Furuhashi N, Fukaya T, Suzuki M, Kono H, Tachibana Y** 1983 Changes of serum gonadotropin levels and sex differences in premature and mature infant during neonatal life. *J Clin Endocrinol Metab* 56:1327-1331
31. **Schmidt H, Schwarz HP** 2000 Serum concentrations of LH and FSH in the healthy newborn. *Eur J Endocrinol* 143:213-215
32. **Chada M, Prusa R, Bronsky J, Pechova M, Kotaska K, Lisa L** 2003 Inhibin B, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol and their relationship to the regulation of follicle development in girls during childhood and puberty. *Physiol Res* 52:341-346
33. **Chada M, Prusa R, Bronsky J, Kotaska K, Sidlova K, Pechova M, Lisa L** 2003 Inhibin B, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone during childhood and

puberty in males: changes in serum concentrations in relation to age and stage of puberty. *Physiol Res* 52:45-51

34. **Tomlinson C, Macintyre H, Dorrian CA, Ahmed SF, Wallace AM** 2004 Testosterone measurements in early infancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89:F558-F559
35. **Lee MM, Donahoe PK, Silverman BL, Hasegawa T, Hasegawa Y, Gustafson ML, Chang YC, MacLaughlin DT** 1997 Measurements of serum Müllerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads. *N Engl J Med* 336:1480-1486
36. **De Schepper J, Verlinde F, Cortvrindt R, Callewaert M, Smitz J** 2000 Serum inhibin B in normal term-born male and female neonates during the first week of life. *Eur J Pediatr* 159:465-469
37. **Byrd W, Bennett MJ, Carr BR, Dong Y, Wians F, Rainey W** 1998 Regulation of biologically active dimeric inhibin A and B from infancy to adulthood in the male. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2849-2854
38. **Wallace EM, Crossley JA, Riley SC, Balfour C, Groome NP, Aitken DA** 1998 Inhibin-B and pro-alphaC-containing inhibins in amniotic fluid from chromosomally normal and Down syndrome pregnancies. *Prenat Diagn* 18:213-217
39. **Wallace EM, Riley SC, Crossley JA, Ritoe SC, Horne A, Shade M, Ellis PM, Aitken DA, Groome NP** 1997 Dimeric inhibins in amniotic fluid, maternal serum, and fetal serum in human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 82:218-222
40. **Riley SC, Wathen NC, Chard T, Groome NP, Wallace EM** 1996 Inhibin in extra-embryonic coelomic and amniotic fluids and maternal serum in early pregnancy. *Hum Reprod* 11:2772-2776