

Tratamiento de varones oligozoospermicos con FSH ultrapura: relación entre la secreción de gonadotropinas, inhibina B y espermatogénesis

J. Díaz Fernández¹, M. Fernández Arjona², J.M. Rodríguez Rodríguez³, J. González Hinojosa³, E.M. Gimbert Burgos⁴, C. Frau Socias¹, I. Cortes Arangué², A. Luque Mialdea³

Resumen

El tratamiento con FSH puede mejorar la espermatogénesis. Algunos estudios muestran una relación entre las concentraciones séricas de inhibina B y FSH en sujetos sanos. Sin embargo, no ha sido encontrada una relación clara en varones con diversos trastornos reproductivos. Nuestro objetivo fue estudiar la posible relación entre las concentraciones de gonadotropinas circulantes, inhibina B y la espermatogénesis en varones oligozoospermicos y evaluar el efecto beneficioso del tratamiento con FSH ultrapura sobre la mejora de la calidad del espermatozoide.

Se han estudiado 68 varones oligozoospermicos. Las concentraciones hormonales y los espermogramas han sido analizado basalmente (pretratamiento) y después de la estimulación con FSH. Tras 3 meses de tratamiento, en la mayoría de los pacientes, el espermograma ha mejorado. Antes del tratamiento, se observaron correlaciones inversas y estadísticamente significativas entre las concentraciones de: inhibina B y FSH; inhibina B y testosterona; e inhibina B y LH.

Estos resultados apoyan el papel de la inhibina B en el control fisiológico por retroalimentación negativa de la secreción de FSH y refleja la estimulación que realiza la FSH sobre las células de Sertoli. Además, la inhibina B es un importante marcador sérico de las funciones reproductiva y testicular. Finalmente, el tratamiento con FSH es efectivo y seguro para estimular la espermatogénesis, la calidad del espermatozoide y la esteroidogénesis.

Introducción

Los varones con alteraciones en el espermograma frecuentemente muestran tasas reducidas de fertilidad (1). Concentraciones dentro del rango de referencia de la hormona foliculoestimulante (FSH) no son absolutamente imprescindibles para la producción de espermatozoides, pero si son necesarias para el mantenimiento de una adecuada espermatogénesis. Además, la FSH es necesaria mediante su unión a la célula de Sertoli para producir el soporte nutricional de las células germinales, y para la síntesis de diversas sustancias vitales para una correcta espermatogénesis como el factor de crecimiento seminífero y la propia inhibina (2,3).

Summary

FSH treatment may improve spermatogenesis quality. Many studies show a relationship between inhibin B and FSH levels in normal men, however no clear relationship has been found in men with various reproductive disorders. We studied the possible relationships between circulating gonadotropin, inhibin B and spermatogenesis in oligozoospermic patients, and evaluated the potential of highly purified FSH treatment to improve sperm quality.

We studied 68 oligozoospermic men. Serum hormone levels and spermograms were analyzed basally (pretreatment) and after FSH stimulation. After 3 months of treatment, in the most of patients, significant increase in semen parameters were observed. Before treatment we observed a significant inverse correlations between: inhibin B and FSH levels; inhibin B and testosterone levels; and inhibin B and LH levels.

In conclusion, these results support the hypothesis that inhibin B is involved in the physiological feedback control of FSH secretion and reflects FSH-stimulated Sertoli cell function. Also, inhibin B is therefore an important additional serum marker of reproductive and testicular functions. Finally, the FSH treatment is effective and safe to stimulate spermatogenesis, sperm quality and steroidogenesis.

La inhibina ha sido definida como una hormona glicoproteica de origen gonadal que posee un efecto inhibitorio sobre la producción de gonadotropinas a nivel de la hipófisis. La fracción inhibina B es la más importante en el varón, mientras que la fracción inhibina A es prácticamente indetectable. Concretamente, la inhibina B es secretada por las células de Sertoli en respuesta al estímulo de la FSH y ejerce un efecto inhibitorio sobre la producción de FSH mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (2,3). Las distintas formas de inhibina están presentes en la circulación de varones sanos, sus concentraciones se incrementan por la estimulación con FSH. Además, la cantidad de inhibina B producida por las células de Sertoli, refleja la función de estas células (4,5).

La introducción de nuevos métodos de cuantificación de la concentración sérica de inhibina B que no poseen reacciones cruzadas con la fracción, han establecido una interesante vía para el estudio del papel que desempeña la inhibina en el control de la secreción de FSH y podrían convertir su determinación plasmática como un marcador adecuado de la función de

¹Servicio de Análisis Clínicos. Hospital «Francesc de Borja». Gandía. Valencia.

²Servicio de Urología. ³Servicio de Ginecología y Obstetricia. ⁴Servicio de Anestesiología y Reanimación. Hospital «Santa Bárbara». Puertollano. Ciudad Real.

Recibido: 10-1-01

Aceptado: 16-8-01

las células de Sertoli. En estudios anteriores, se ha demostrado la existencia de una relación inversa entre las concentraciones plasmáticas de inhibina B y FSH en varones normales (6-9). Sin embargo, esta relación no ha sido descrita en pacientes con diversos trastornos reproductivos. Por otro lado, otras investigaciones muestran cambios en la concentración de inhibina tanto de varones normales como de pacientes hipogonadotrópicos tras el tratamiento con FSH (9-11).

En teoría, el tratamiento de varones oligozoospermicos con FSH puede proporcionar una adecuada estimulación endocrina de las células de Sertoli, facilitar las funciones FSH dependientes y mejorar la espermatogénesis, sin interferir las funciones de las células de Leydig y la producción local de estradiol, el cual, puede ejercer un efecto deletéreo sobre las fases iniciales de la espermatogénesis (12,13).

Se ha descrito que la inhibina ejerce un efecto regulador local sobre las células germinales y sobre las células de Leydig (2,3,7). Por otro lado, en controles realizados en sujetos sanos, no se ha observado correlación entre las concentraciones de inhibina y las de la hormona luteinizante (LH) y testosterona, pero sí con las de FSH y el recuento de espermatozoides. Recientemente, se ha sugerido que la alteración funcional de la célula de Sertoli puede ser responsable de la oligozoospermia idiopática, por lo que se podría hipotetizar que estos casos puedan ser identificados en base a una respuesta anormal de la inhibina a la estimulación con gonadotropinas exógenas (6,7). También se ha descrito la posible existencia de receptores de la FSH a nivel de la espermatogonia, de tal modo que la administración exógena de FSH podría mejorar la calidad de la espermatogénesis al obtener espermatozoides con una ultraestructura más correcta que aumente el índice de fecundación de los ovocitos (1,12).

En la mujer se ha evidenciado una peor respuesta de la gónada al estímulo de la FSH con la disminución de la reserva de las células germinales del ovario, lo que obligaría al aumento de las concentraciones de FSH circulantes para obtener la respuesta deseada (4). Dado que existe cierto paralelismo entre el funcionalismo ovárico y testicular, parece lógico pensar que las concentraciones de inhibina B y FSH, y su correlación con los parámetros seminales en pacientes con infertilidad idiopática, permitan conocer *a priori*, qué pacientes se podrían beneficiar de la administración de FSH exógena. Además, la monitorización de estas hormonas puede ser útil para establecer el posible pronóstico de dicho tratamiento, evitando el mantenimiento del mismo en aquellos pacientes en los que se prevea una falta de respuesta.

En la actualidad, la administración de FSH ultrapura presenta una excelente tolerancia y ausencia de efectos secundarios (12-14). Por otro lado, la administración subcutánea (s.c.) proporciona mayor biodisponibilidad y menores fluctuaciones de las concentraciones plasmáticas de FSH que cuando se administra por vía intramuscular (12). Por último, sus ventajas farmacológicas hacen que presente una alta eficiencia y eficacia clínicas (14) que demuestran que la administración de FSH ultrapura es el preparado de elección en el tratamiento médico de los varones afectados de infertilidad (oligo-asteno-terato-zoospermias idiopáticas).

Dada la importancia del análisis seminal y la cuantificación de las concentraciones séricas de testosterona, LH, FSH e inhibina B como marcadores de la infertilidad masculina, nos planteamos realizar este estudio con los siguientes objetivos: 1º) describir la respuesta de estos parámetros analíticos tras la

administración s.c. de FSH ultrapura empleada en el tratamiento de pacientes oligozoospermicos con problemas de infertilidad; 2º) estudiar la posible relación entre las concentraciones hormonales y la espermatogénesis; y 3º) evaluar si el tratamiento de pacientes oligozoospermicos con FSH ultrapura mejora la calidad del espermatozoide y aumenta la tasa de fertilidad masculina.

Material y métodos

Pacientes, toma de muestras y preparación de especímenes

Con el consentimiento del Comité de Investigación del Hospital «Santa Bárbara», se analizó suero y semen de 68 pacientes oligozoospermicos, los cuales presentaban antecedentes de al menos 18 meses con problemas de infertilidad (15). El estudio, se realizó entre Enero de 1998 y Marzo de 2001. La edad media de los varones fue 33 ± 4 años (rango 26-43). El correspondiente consentimiento informado fue firmado por todos los pacientes antes de entrar en el estudio.

Para conocer su estado de salud, los pacientes fueron sometidos a un riguroso estudio clínico, y cribaje bioquímico y hematológico (16). Los criterios de inclusión han sido: pacientes con oligozoospermia idiopática con o sin astenozoospermia y/o teratozoospermia (14). La oligozoospermia fue evidenciada al menos en 2 seminogramas realizados un máximo de 2 semanas antes de iniciarse el tratamiento. Los criterios de exclusión fueron: edad \geq a 50 años, FSH sérica basal \geq 12 UI/L, enfermedad sistémica que pudiese justificar la alteración espermática, tratamientos farmacológicos que pudiesen alterar la investigación, causas orgánicas (varicocele, criptorquidia, inflamación y/o infección genital o de las vías seminales, tumoración gonadal, alteraciones genéticas y obstrucción de las vías seminales), y aparición de efectos secundarios tras el inicio del tratamiento con FSH ultrapura.

Se empleó la cuantificación de las concentraciones hormonales y el espermiograma para evaluar la eficacia del tratamiento con FSH instaurado, es decir, la calidad del espermatozoide expresada en términos de motilidad, morfología, viabilidad, y concentraciones séricas de testosterona, inhibina B, LH y FSH. Finalmente, los pacientes fueron clasificados en dos grupos: grupo A (varones con adecuada o muy buena respuesta al tratamiento) y grupo B (varones con pobre o nula respuesta al tratamiento).

Las muestras de semen y sangre fueron obtenidas simultáneamente en todos los pacientes entre las 8-9 horas de la mañana. Las concentraciones plasmáticas hormonales fueron analizadas al inicio del estudio y tras la estimulación con FSH. En ambos momentos, (pretratamiento y postratamiento), dos muestras sanguíneas fueron recogidas con un intervalo de 20 minutos y analizadas en forma de *pool*. El espermiograma se efectuó por duplicado con un intervalo de 15 días tanto en condiciones basales como durante las primeras 3 semanas postratamiento. El semen fue obtenido en el Laboratorio mediante masturbación sobre recipientes de plástico tras 3-5 días de abstinencia sexual y sin usar preservativos. El espermiograma se realizó tras licuefacción completa del eyaculado a 37 °C. El recuento espermático, estudio de la motilidad, morfología y viabilidad, se analizaron mediante los métodos estándar descritos por la Organización Mundial de la Salud (15).

Tabla I. Sensibilidad, rango de referencia y coeficientes de variación intraensayo como interensayo de la determinación sérica de testosterona (nmol/L), LH (UI/L), FSH (UI/L) e inhibina B (pg/mL).

	Testosterona	LH	FSH	Inhibina B
C.V. interensayo (%)	7,4	6,9	5,9	7,2
C.V. intraensayo (%)	4,6	5,6	5,8	5,1
Sensibilidad	0,1	0,5	0,4	15,0
Rango de referencia	9,9-27,8	2,0-12,0	1,0-8,0	130-250

C.V.: Coeficiente de variación.

Hormona luteinizante (LH). Hormona foliculoestimulante (FSH).

Fármacos empleados y régimen terapéutico

La FSH fue utilizada en ampollas con 75 UI de FSH ultrapura (Neofertinorm HP[®], Serono Laboratorios S.A., Madrid, España). A todos los pacientes, se les administró por vía s.c. inyecciones de FSH (75 UI cada día) durante 3 meses consecutivos. Tras la finalización del tratamiento, se realizaron los correspondientes espermigramas y análisis hormonales, durante las 3 primeras semanas.

Reactivos, instrumentos y procedimientos

Las concentraciones séricas de FSH y LH fueron cuantificadas por enzimoimmunoanálisis de micropartículas (MEIA; AxSym[®], ABBOTT Laboratories, Illinois, USA). Las concentraciones séricas de testosterona han sido determinadas mediante electroquimioluminiscencia (ECLIA; Elecsys Systems 2010[®], Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). La concentración plasmática de inhibina B fue determinada por enzimoimmunoanálisis (ELISA; Serotec[®] Limited, Oxford, UK). Tanto la sensibilidad, como los rangos de referencia y los coeficientes de variación intraensayo e interensayo se citan en la tabla I.

Estudio estadístico

El estudio estadístico (media, desviación estándar, prueba T de Wilcoxon, prueba U de Mann-Whitney, prueba de Kolmogorov-Smirnov y análisis de regresión) se realizó con el paquete informático SPSS V 7.05 para WINDOWS (SPSS Inc., Chicago, USA). Los valores hormonales y del espermograma tras el tratamiento, fueron comparados con los obtenidos al inicio del estudio (basales). En todas las comparaciones, la hipótesis nula fue rechazada si la probabilidad fue inferior a 0.05.

Resultados

Los resultados de la concentración de las hormonas estudiadas y de los parámetros del espermograma siguen una distribución de frecuencias gaussiana, verificada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La mayoría de los pacientes estudiados, mostraron un gran interés por procrear, y 8 de sus esposas, es decir, el 11,8%, se quedaron embarazadas durante el estudio. Después de 3 meses de tratamiento, en 47 varones, se observaron incrementos significativos de los parámetros del espermograma estudiados (Tabla II).

En todos los pacientes, las concentraciones basales de testosterona, LH y FSH estaban dentro de los rangos de referencia correspondientes, y solo en 41 varones estudiados, los va-

Tabla II. Espermograma y concentraciones séricas de testosterona, hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH) e inhibina B pretratamiento o basal, y postratamiento en varones oligozoospermicos (n=68).

	Pretratamiento	Postratamiento
Recuento espermatozoides ($\times 10^9/L$)	12,0 \pm 4,5	17,5 \pm 5,1***
Motilidad progresiva (%)	27,1 \pm 4,6	34,4 \pm 4,5***
Viabilidad (%)	41,9 \pm 10,8	56,7 \pm 11,5**
Formas normales (%)	34,9 \pm 3,6	42,8 \pm 7,6*
Testosterona (nmol/L)	17,2 \pm 5,3	21,5 \pm 5,8*
LH (UI/L)	2,95 \pm 1,11	4,70 \pm 1,47***
FSH (UI/L)	3,80 \pm 1,35	5,89 \pm 1,58***
Inhibina B (pg/mL)	135,0 \pm 36,7	112,7 \pm 34,1*

Valores expresados como media \pm desviación estándar.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ versus pretratamiento o basal.

lores plasmáticos de inhibina B estaban dentro del rango de referencia. Las concentraciones basales de LH y testosterona aumentaron de modo paralelo a las de FSH, y estos incrementos fueron estadísticamente significativos, es decir, se puede afirmar que respondieron al tratamiento con FSH. Por el contrario, la concentración plasmática de inhibina B tras el tratamiento, fue significativamente inferior a la basal (Tabla II).

Durante la administración de FSH, la concentración plasmática de inhibina B, fue decreciendo paulatinamente. En condiciones basales, es decir, antes de iniciar el tratamiento, se observan correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de: inhibina B y FSH ($r = -0,56$; $p < 0,01$); inhibina B y testosterona ($r = 0,48$; $p < 0,05$); e inhibina B y LH ($r = 0,46$; $p < 0,05$). Por el contrario, tras el tratamiento, no se observó correlación entre las concentraciones de inhibina B y FSH. Además, no existen correlaciones significativas entre la concentración de inhibina B, y el recuento espermático, motilidad progresiva, viabilidad, formas normales, mientras que si hay correlación estadísticamente significativa entre: concentraciones basales de LH y testosterona ($r = 0,55$; $p < 0,01$); concentración de LH y recuento de espermatozoides antes del tratamiento ($r = 0,45$; $p < 0,05$); concentración de testosterona y recuento espermático basal ($r = 0,56$; $p < 0,05$). Las correlaciones citadas, desaparecen tras el tratamiento con FSH.

Finalmente, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de inhibina B de los varones del grupo A (varones con adecuada o muy buena respuesta al tratamiento) y los del grupo B (varones con pobre o nula respuesta al tratamiento), tanto antes como después del tratamiento. Además, si comparamos las concentraciones séricas de FSH, en ambos grupos tras el tratamiento, se aprecia un incremento estadísticamente significativo en los pacientes del grupo A (Tabla III).

Discusión

En este trabajo, se estudia una situación clínica real con varones atendidos en las consultas de Andrología y Ginecología de nuestro hospital, los cuales, son diagnosticados como pacientes oligozoospermicos con problemas de fertilidad. A todos

Tabla III. Comparación de los valores de inhibina B (pg/mL) y de FSH (UI/L) en los pacientes estudiados antes y después del tratamiento, y clasificados según la respuesta al tratamiento en: grupo A (varones con adecuada o muy buena respuesta al tratamiento) y grupo B (varones con pobre o nula respuesta al tratamiento).

	Grupo A (n=47)	Grupo B (n=21)
Inhibina B pretratamiento	136,1 ± 35,2	131,1 ± 33,4
Inhibina B postratamiento	111,6 ± 33,1	114,9 ± 34,1
FSH pretratamiento	3,74 ± 1,64	3,93 ± 1,77
FSH postratamiento	6,34 ± 1,26*	6,91 ± 1,31

Valores expresados como media±desviación estándar.

* $p < 0,05$ versus pretratamiento o basal. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

ellos, se les insta un tratamiento con FSH ultrapura, y se estudian las modificaciones de los valores del espermograma y los correspondientes análisis hormonales antes y después del tratamiento, para tratar de dilucidar la utilidad de la inhibina B como marcador de la espermatogénesis.

Durante el tratamiento con FSH, el recuento espermático y los distintos parámetros del seminograma mejoran en 47 de los pacientes, aunque todavía algunos de estos varones no alcanzan el rango de referencia. A pesar de ser un buen resultado, puede que la duración del tratamiento sea relativamente corta para normalizar por completo el espermograma (15). Sin embargo, hay que tener en cuenta que no son necesarios valores rigurosamente normales en el seminograma para no tener problemas de infertilidad (14). Sobre todo, hay que destacar que la calidad del esperma, motilidad progresiva, vitalidad y morfología observadas tras el tratamiento con FSH ultrapura, son mejores que los descritos por otros autores (14,17).

Los resultados expuestos en este trabajo muestran una correlación inversa entre las concentraciones séricas de inhibina B y FSH en pacientes oligozoospermicos antes del tratamiento, la cual, no se observa tras el mismo. Esta correlación ha sido descrita anteriormente en otro estudio, pero en donantes de semen (7). Por ello, estos datos sugieren que la inhibina B posee una importante función en la regulación fisiológica de la secreción de FSH en varones. Tras el tratamiento con FSH ultrapura, no existe correlación entre las concentraciones de inhibina B y LH, ni entre la inhibina B y testosterona, pero si existe correlación entre la concentración plasmática de inhibina B y el recuento espermático antes del tratamiento. Todo ello indica que la secreción de inhibina por las células de Sertoli esta regulada por la interacción con las células germinales (18). Además, la concentración plasmática de inhibina B es progresivamente menor en los varones con alteraciones de la espermatogénesis, e indetectables en hombres con azoospermia (7).

Este estudio es uno de los primeros artículos que muestran una correlación inversa entre las concentraciones plasmáticas de inhibina B y FSH en varones oligozoospermicos. De este modo, los datos presentados, apoyan la participación de la inhibina B en la regulación de la secreción de gonadotropinas en varones. Todo ello, junto con la relación inversa descrita entre la inhibina B y la FSH en varones oligozoospermicos, dan consistencia a la hipótesis que la inhibina B es la forma fisiológica más importante dentro de la familia de las inhibinas, la cual

ejerce un papel crucial en el funcionalismo hipotalámico-hipofisario-testicular (2,3).

Se ha descrito que la inhibina B inmunorreactiva se origina en las células de Sertoli, y podría ser que la concentración plasmática de inhibina B circulante refleje la intensidad de la interacción entre las células de Sertoli y las células germinales, principalmente en el proceso de maduración de las espermátides. Por ello, se ha propuesto a la inhibina B como marcador bioquímico útil para el estudio de la función de las células de Sertoli y de las células germinales (2,18).

Actualmente, el tratamiento de la infertilidad idiopática masculina no está resuelto. Por ello son necesarios estudios que establezcan factores pronósticos para evaluar los resultados de la terapia instaurada. Dado que la inhibina B es un marcador de la función exocrina del testículo, el modelo presentado en este trabajo podría ser adecuado para establecer el diagnóstico y evaluar las distintas modalidades de terapias empleadas en la infertilidad masculina (19,20).

En la tabla III, se muestran los valores de inhibina B y de FSH en los pacientes estudiados antes y después del tratamiento, clasificados según la calidad de la respuesta al tratamiento en: grupo A (varones con adecuada o muy buena respuesta al tratamiento) y grupo B (varones con pobre o nula respuesta al tratamiento). Se observa que las concentraciones basales de inhibina B, son similares y no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, tanto antes como después del tratamiento. Además, si se compara al mismo tiempo, las concentraciones séricas de FSH, en ambos grupos, podremos apreciar un incremento estadísticamente significativo en los pacientes del grupo A, mientras que no ocurre lo mismo en el grupo B. Estos resultados difieren ligeramente de los descritos por otros autores, debido posiblemente a que en nuestra investigación se estudian varones oligozoospermicos y se describe la situación clínica que se plantea diariamente en las consultas de este hospital (5,19,20). Por último, se podrían obtener resultados más significativos si se realiza un estudio multicéntrico con mayor número de pacientes.

De lo descrito anteriormente, se deduce que se podrían seleccionar antes del inicio del tratamiento aquellos varones susceptibles de beneficiarse de la administración exógena de FSH ultrapura, y evitar de este modo, su mantenimiento en aquellos pacientes en los que prevea una falta de respuesta al tratamiento exógeno con FSH, con lo cual queda demostrada la utilidad de la cuantificación de inhibina B como pronóstico de respuesta al tratamiento.

En conclusión, estos resultados apoyan la hipótesis que la inhibina B participa en los mecanismos fisiológicos de retroalimentación negativa de la secreción de FSH y refleja la función de las células de Sertoli. Además, la inhibina B podría ser un marcador sérico de las funciones testicular y reproductiva. Finalmente, el tratamiento con FSH ultrapura es efectivo para estimular la espermatogénesis, la calidad del esperma y la esteroidogénesis.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por Laboratorios Serono S.A.

Correspondencia
Julián Díaz Fernández
C/ José María Mortes Lerma,
32 Dpl, Pta 14
46014 Valencia

Bibliografía

1. Bartoov B, Eltes F, Lunenfeld E, Har-Even D, Lederman H, Lunenfeld B. Sperm quality of subfertile males before and after treatment with human follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 1994; 61: 727-34.
2. Wallace EM, Healy DL. Inhibins and activins: roles in clinical practice. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103: 945-56.
3. De Kretser D, McFarlane JR. Inhibin in the male. *J Androl* 1996; 17: 179-82.
4. Balasch J, Gonzalez-Merlo J. La inhibina y la práctica clínica en obstetricia y ginecología. *Prog Obstet Ginecol* 1999; 49: 699-702.
5. Bohring C, Krause W. Serum levels of inhibin B in men with different causes of spermatogenic failure. *Andrologia* 1999; 31: 137-41.
6. Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNeilly AS, et al. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3341-5.
7. Illingworth PJ, Groome NP, Byrd W, Rainey WE, McNeilly AS, Mather JP, et al. Inhibin B: A likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1321-5.
8. Anderson RA, Wallace EM, Groome NP, Bellis AJ, Wu FCW. Physiological relationships between inhibin B, follicle stimulating hormone secretion and spermatogenesis in normal men and response to gonadotrophin suppression by exogenous testosterone. *Human Reproduction* 1997; 12: 746-51.
9. De Kretser DM, McLachlan RI, Robertson DM, et al. Serum inhibin levels in normal men and men with testicular disorders. *J Endocrinology* 1989; 120: 517-23.
10. Shekter CB, McLachlan RI, Tenove JS, et al. Serum inhibin concentrations rise during GnRH treatment of men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 1221-4.
11. McLachlan RI, Matsumoto AM, Burger HG, et al. Follicle-stimulating hormone is required for quantitatively normal inhibin secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 1305-8.
12. Handelsman DJ, Turner L, Boylan M, et al. Pharmacokinetics of human follicle stimulating hormone in gonadotrophin deficient men. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1657-63.
13. Howless CM, Loumaye E, Giroud D, Luyet G. Multiple follicular development and ovarian steroidogenesis following subcutaneous administration of a highly purified urinary FSH preparation in pituitary desensitized women undergoing IVF: a multicentre European phase III study. *Human Reprod* 1994; 9: 424-30.
14. Burgues S, Calderon MD. Subcutaneous self-administration of highly purified follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin for the treatment of male hypogonadotropic hypogonadism. *Human Reprod* 1997; 12: 980-6.
15. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
16. Díaz J, Fernández-Arjona M, Perandones C, Serrano E, Frau C, Cortes I, et al. Reference intervals for biochemistry parameters for evaluation of oxidative stress in human sperm. *Clin Chem* 1998; 44: 2197-9.
17. Kliesch S, Behre HM, Nieschlag E. High efficacy of gonadotrophin or pulsatile gonadotrophin releasing hormone treatment in hypogonadotropic hypogonadal men. *Eur J Endocrinol* 1994; 131: 347-54.
18. Carreau S. Human Sertoli cells produce inhibin in vitro: an additional marker to assess the seminiferous epithelium development. *Human Reprod* 1995; 9: 373-4.
19. Pierik FH, Vreeburg JTM, Stijnen T, De Jong FH, Weber RFA. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3110-4.
20. Klingmuller D, Haidi G. Inhibin B in men with normal and disturbed spermatogenesis. *Hum Reprod* 1997; 12: 2376-8.