

2 of 10.17

Universidad Nacional Autónoma de México



FACULTAD DE QUIMICA

HORMONA LIBERADORA DE LAS
GONADOTROPINAS (GnRH)

TRABAJO MONOGRAFICO MANCOMUNADO

RICARDO CABRERA CARDENAS
ESTHER HANENBERG MILVER

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO



1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

I N D I C E

PREFACIO	I
INTRODUCCION	II
GLOSARIO DE ABBREVIATURAS	VI
CAPITULO 1. HIPOTALAMO	1
1.1 ANATOMIA DEL HIPOTALAMO	2
CAPITULO 2. HIPOFISIS	8
2.1 ADENOHIPOFISIS.....	9
2.2 NEUROHIPOFISIS.....	11
CAPITULO 3. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA GnRH(LHRH) Y ANALOGOS	13
3.1 PURIFICACION DE LA GnRH.....	19
3.2 DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA QUI- MICA DE LA LH-RH.....	24
3.3 SINTESIS DE LA LH-RH Y SUS ANALOGOS.....	27
3.4 RELACION ENTRE LA ESTRUCTURA Y ACTI- VIDAD. ANALOGOS DE LA LH-RH.....	30
CAPITULO 4. REGULACION, METABOLISMO, MECANISMOS DE ACCION DE LA GnRH Y SU PAPEL EN LA RE- GULACION DE LA SECRECION DE GONADOTRO- FINAS	54

4.1 REGULACION.....	55
4.1.1 REGULACION POR ESTEROIDES DE LA SECRECION DE GONADOTROFINAS.....	55
4.1.1.1 ESTROGENOS.....	59
4.1.1.2 PROGESTERONA.....	64
4.1.1.3 ANDROGENOS.....	66
4.1.2 LA GnRH Y SU PAPEL EN LA SECRE- CION DE LAS GONADOTROFINAS.....	68
4.1.3 FACTORES NO ESTEROIDALES COMO POSIBLES REGULADORES DE LA SE- CRECION DE GONADOTROFINAS.....	75
4.1.3.1 INHIBINA.....	75
4.1.3.2 PROSTAGLANDINAS.....	77
4.1.4 FACTORES AMBIENTALES QUE MODU- LAN LA SECRECION DE LAS GONA- TROFINAS.....	79
4.1.4.1 LUZ.....	79
4.1.4.2 OLOR.....	81
4.1.4.3 LACTANCIA.....	82
4.1.5 NEUROCONTROL DE LA SECRECION DE LAS GONADOTROFINAS.....	83
4.1.5.1 CATECOLAMINAS.....	83

4.1.5.2	CATECOLESTROGENOS.....	89
4.1.5.3	ENDORFINAS.....	92
4.1.5.4	ENDOPEPTIDASAS.....	97
4.1.6	BIOSINTESIS DE LA GnRH.....	101
4.2	MECANISMOS DE ACCION DE LA GnRH.....	102
4.2.1	INTERACCION CON RECEPTORES.....	104
4.2.2	INTERACCION POSTRECEPTOR.....	111
4.3	ACCIONES EXTRAHIPOFISIARIAS DE LA GnRH.....	115
4.3.1	PREVENCION DEL AUMENTO DEL PESO OVARICO INDUCIDO POR LA hCG EN ANIMALES HIPOFISECTOMI- ZADOS.....	116
4.3.2	PREVENCION DEL DESARROLLO FOLICULAR INDUCIDO POR LA FSH.....	117
4.3.3	PREVENCION DEL DESARROLLO DE RE- CEPTORES PARA LA LH EN FOLICULOS PREOVULATORIOS ASI COMO DE LA ES- TEROIDOGENESIS(OVARICA Y TESTICU- LAR).....	118
4.3.4	ESTIMULACION DE LA SINTESIS DE PROSTAGLANDINAS.....	122

4.3.5 ESTIMULACION DE LA MADURACION MEIOTICA DE LOS OOCITOS.....	122
4.3.6 ESTIMULACION DE LA SINTESIS DE ACIDO FOSFATIDICO Y FOSFATIDIL INOSITOL EN CELULAS LUTEALES.....	123
4.3.7. ESTIMULACION DE LA PRODUCCION DEL ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO.....	123
BIBLIOGRAFIA.....	126

CAPITULO 5. APLICACIONES CLINICAS DE LA GnRH Y SUS

ANALOGOS.....	180
5.1 ANALOGOS AGONISTAS DE LA GnRH COMO AGENTES ANTICONCEPTIVOS UTILIZADOS EN HEMBRAS.....	183
5.1.1 EFECTOS PREOVULATORIOS.....	184
5.1.1.1. INHIBICION DE LA OVULACION.....	184
5.1.2 EFECTOS POSTOVULATORIOS.....	188
5.1.2.1 INDUCCION DE LA LUTEOLISIS.....	188
5.2 ANALOGOS DE LA GnRH COMO ANTICON- CEPTIVOS UTILIZADOS EN MACHOS.....	192
5.2.1 INHIBICION DE LOS RECEPTORES TESTI- CULARES PARA LAS GONADOTROPINAS.....	194

5.2.2	INHIBICION DE LA ESTEROIDOGENESIS TESTICULAR Y DE LA ESPERMATOGENESIS.....	194
5.2.3	EFFECTOS INDESEABLES Y PERSPECTIVAS.....	197
5.3	ANALOGOS ANTAGONISTAS DE LA GnRH COMO POSIBLES AGENTES ANTICONCEPTIVOS.....	198
5.4	APLICACIONES CLINICAS.....	200
5.4.1	MUJERES.....	201
5.4.1.1	INDUCCION DE LA OVULACION.....	201
5.4.1.1.1	AMENORREA PRIMARIA.....	203
5.4.1.1.2	AMENORREA SECUNDARIA.....	204
5.4.1.2	ENDOMETRIOSIS.....	204
5.4.1.3	CANCER MAMARIO.....	206
5.4.1.4	SUPRESION DE LA HPERSECRECION ANDROGENA POR LOS OVARIOS.....	206
5.4.2	HOMBRES.....	207
5.4.2.1	HIPOGONADISMO HIPOGONADOTROFICO.....	208
5.4.2.2	CRIPTOORQUIDISMO Y OLIGOSPERMIA.....	210
5.4.2.3	CANCER PROSTATICO.....	211
5.5	APLICACIONES DIVERSAS EN AMBOS SEXOS.....	212
5.5.1	PUBERTAD RETARDADA.....	212
5.5.2	PUBERTAD PRECOZ.....	212
	BIBLIOGRAFIA.....	215

PREFACIO

Uno de los problemas mas graves de la civilización actual es la explosión demográfica. Desgraciadamente, este problema ha pasado a ser secundario ya que publicaciones periodísticas han intentado demostrar que el número de nacimientos en los años setentas no sobrepasó al obtenido en los años sesentas. Es cierto, que el crecimiento demográfico en la década pasada no aumentó tan rápidamente como las proyecciones demográficas predecían, aunque la velocidad del incremento fué y es aún, suficientemente alta como para duplicar la población mundial a 8 billones o más, a mediados del siguiente siglo, si no es que antes.

Realmente la situación en la década de los ochentas es aún más grave que en la década anterior, ya que la gran cantidad de niños nacidos durante los últimos 20 años se encuentra ahora en etapa reproductiva, lo que significa nuevos incrementos demográficos.

Una estimación general del número de mujeres con riesgo de embarazo a nivel mundial ha aumentado de 500 millones en 1971 a 600 millones en 1979; y lo peor aún, es que solamente un 20 a 25% de estas mujeres y su pareja, utilizan alguna forma de evitar el embarazo (1).

El uso de los métodos anticonceptivos existentes presen-

ta algunas restricciones, ya que no son aceptados totalmente por diferencias culturales, religiosas o personales; desarrollan efectos secundarios, entrando en juego la seguridad personal; la baja eficiencia de algunos de los métodos y el costo. Por eso los métodos anticonceptivos deben ser seguros, baratos, de aplicación sencilla y fáciles de distribuir y almacenar.

Entonces, puede observarse la importancia de este trabajo de investigación monográfica, en el que se delinearán las características principales de una sustancia natural que puede actuar como anticonceptivo tanto para mujeres como para hombres, así como un fármaco para el tratamiento de muchas enfermedades de tipo endocrinológico...

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Zatzuchni, G., D. Shelton, J. J. Sciarra (Eds.) LR-RH peptides as a female and male contraceptives, Harper and Row Publishers p. XI, 1981.

INTRODUCCION

En la última década, se ha observado un avance agigantado en el entendimiento de los mecanismos que regulan las funciones sexuales y de la reproducción tanto en animales como en humanos. Con este avance en los conocimientos, se aumenta nuestra habilidad para estimular o inhibir la fertilidad, dando este último campo nuevas posibilidades de anticoncepción.

Los esfuerzos de la investigación se han encaminado a determinar el papel del hipotálamo en el control de la reproducción, estableciendo a éste, como la unión entre el sistema nervioso y el sistema endócrino.

Así es como el esfuerzo de muchos científicos ha contribuido al descubrimiento de los llamados "factores de liberación" (releasing factors (RF)) y su caracterización química-fisiológica. Son estos factores, los que regulan la liberación de las gonadotropinas (Gntr): hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), tanto en hombres como en mujeres.

Durante mucho tiempo se pensó que existían factores liberadores específicos para cada una de las gonadotropinas, pero hasta ahora sólo se ha identificado fisiológica y químicamente, la existencia de un solo factor que regula la liberación de ambas. Con respecto a la prolactina (PRL), no se ha logrado caracterizar químicamente ningún factor que regule la

liberación de esta hormona.

Durante los primeros años de los años sesenta, se descubrió la existencia de el factor liberador de la LH (LHRH), mediante investigaciones basadas en su efecto fisiológico, evaluando la liberación de gonadotrofinas, estimulada por la inoculación in vivo de extractos hipotálamicos.

Fue hasta 1971, que Schally y colaboradores (en porcinos) y Guillemin y colaboradores (en ovinos), lograron determinar la estructura química de este factor. Ambos grupos convergieron en que esta hormona, era un decapeptido, y que su secuencia de aminoácidos era común a todas las especies de mamíferos estudiadas (1).

Obtenida esta información, muchos investigadores iniciaron la síntesis de grandes cantidades de este factor, para poder realizar estudios fisiológicos y farmacológicos. Como resultado de estos estudios, un número importante de mujeres con ciclos anovulatorios y sin defectos en el eje ovárico-hipofisario, obtuvieron buenos resultados en su secreción de gonadotrofinas después de la administración de LHRH sintético. Por lo que se sugirió que este podría ser el tratamiento de elección para aquellos casos de infertilidad en que el defecto funcional reside en el sistema hipotálamo-hipófisis.

Por otra parte, el conocimiento de la estructura de la

molécula de LHRH, ha abierto un nuevo campo de investigación en el control de la fertilidad, pues se ha logrado sintetizar cientos de compuestos con estructura semejante a la LHRH y que de acuerdo a su modo de acción se clasifican en agonistas (aquellos que estimulan la liberación de gonadotrofinas) y en antagonistas (aquellos que inhiben su liberación).

Tan pronto como se lograron sintetizar análogos de esta molécula, un gran esfuerzo se ha dirigido hacia el incremento de la potencia de tales análogos, mediante sustituciones diversas en el decapeptido.

Recientemente se han realizado estudios clínicos con superanálogos sintéticos, comprobándose que algunos de ellos muestran efectos como anticonceptivos potentes, pero se ha concluido que la dosis necesaria para obtener este efecto es todavía alta; y no ha sido posible determinar cual es la ruta de administración más adecuada, así como la posología a seguir. Tampoco se conocen con detalle los efectos colaterales que acompañan a tratamientos prolongados con estos péptidos sintéticos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Guillemin, R. Peptides in the brain: the new endocrinology. Science 202:390-402, 1978

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormona Adenocorticotropina
ALA	Alanina
β (2-naftil)-D-ALA	β (2-naftil)-D-Alanina
cAMP	Adenilil monofosfato cíclico
dbcAMP	Dibutiril adenilil monofosfato cíclico
ARG	Arginina
ATP	Adenilil trifosfato
Ca ²⁺	Ión divalente del calcio
CMC	Carboxi metil celulosa
COMT	Enzima catecol-orto-metil-transferasa
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
Cu ²⁺	Ión divalente del cobre
DDC	Dietilditiocarbamato de sodio
FSH	Hormona estimulante del folículo
FSH-RF	Factor liberador de la FSH
FSH-RH	Hormona liberadora de la FSH
GH	Hormona del crecimiento
GH-RH	Hormona liberadora de la GH
GLU	Acido glutámico
GLY	Glicina

CGMP	Guanilil monofosfato cíclico
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
I ¹²⁵ GnRH	GnRH marcada con iodo radioactivo
Gntr.	Gonadotropinas
HCl	Acido clorhídrico
hCG	Hormona gonagotropina coriónica
HIS	Histidina
K ⁺	Ion monovalente del potasio
K _a	Constante de afinidad
K _{act.}	Constante de activación
LEU	Leucina
N-Metil.LEU	N-Metil Leucina
LH	Hormona luteinizante
LH-RF	Factor liberador de LH
LHRH	Hormona liberadora de la LH
LRP	Factor liberador de la LH
Mg ²⁺	Ión divalente del magnesio
MSH	Hormona melanocito estimulante
Na ⁺	Ión monovalente del sodio
OAAD	Ovarian ascorbic acid depletion test
P ³²	Fósforo 32
PEE ₂	Prostaglandina E ₂

PgF₁	Prostaglandina F ₁
PgF₂	Prostaglandina F ₂
PHE	Fenilalanina
D-pCl-PHE	D-para-cloro-fenilalanina
D-pF -PHE	D-para-fluoro-fenilalanina
PRL	Prolactina
PRO	Prolina
N-ac-Δ^3-PRO	N-acetil- Δ^3 -Prolina
RF's	factores de liberación
RIA	Radioinmunoensayo
mRNA	RNA mensajero
SER	Serina
D-SER(TBU)	Terbutil-D-Serina
SNC	sistema nervioso central
TYR	Tirosina
TRP	Triptofano
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
TSH	Tirotropina

CAPITULO 1

HIPOTALAMO

Durante mucho tiempo se ha sabido que la actividad reproductora en los animales se ve afectada por múltiples factores de tipo ambiental tales como: la nutrición, la luz y la temperatura; y que las aberraciones sexuales en los ciclos menstruales de algunas mujeres, pueden ocurrir como resultado de estímulos ambientales, psicológicos y emocionales adversos(1). Este tipo de observaciones estimularon a muchos investigadores a pensar que el Sistema Nervioso Central(SNC) ejercía un control sobre el sistema endócrino. Esta integración de dos sistemas que a su vez son integradores, puede explicar, como es que las funciones de los sistemas que participan en los múltiples eventos que toman parte durante las diferentes fases de los procesos reproductivos, se encuentran sincronizadas con una alta precisión(2).

El siguiente problema al que se tuvieron que enfrentar fue el de explicar cómo era que la información percibida por el SNC era comunicada al sistema endócrino, representado por la glándula hipófisis.

Harris, fue el primero en indicar que el órgano del SNC encargado de comunicarse con el sistema endócrino, era el hipotálamo(3), visualizando que esta comunicación se llevaba a

cabo mediante neurosecreciones transportadas a la adenohipófisis (ver capítulo 2) a través de un sistema capilar emergente del tallo infundibular y la eminencia media (E.M.). Estas ideas se basaron primeramente en estudios morfológicos realizados en el área de contacto entre el hipotálamo y la adenohipófisis (2,4). Los estudios revelaron una falta total de inervación directa entre los dos órganos.

La habilidad para manufacturar hormonas, había sido tradicionalmente asignada a las glándulas endócrinas: gónadas, tiroides, etc. La sugerencia de que las células nerviosas podían secretar hormonas, las colocaba muy por arriba de su capacidad de secretar neurotransmisores.

El descubrimiento de la existencia de las neurosecreciones, dio origen a la creación de una nueva ciencia: la neuroendocrinología.

1.1. ANATOMIA DEL HIPOTALAMO.

El hipotálamo, es una región localizada en la base del encéfalo; medialmente limita al tercer ventrículo y lateralmente está rodeado por el subtálamo; rostralmente está en relación con la lámina terminalis; dorsalmente con la comisura anterior y el surco hipotalámico que se extiende desde el agujero interventricular al acueducto cerebral y, caudalmente limi

ta con el mesencéfalo (ver figura 1.1). Su parte central está formada en sentido rostrocaudal por la región preóptica, eminencia media, quiasma óptico, tuber cinereum, y los cuerpos mamilares (ver figura 1.2). La eminencia media es una subdivisión del tuber cinereum que a su vez se interconecta a los cuerpos mamilares, quiasma óptico y el principio del tracto óptico.

Las columnas del fornix, dividen sagitalmente al hipotálamo en: zona medial y zona lateral.

La zona medial comprende: a) región supraquiasmática, b) región tuberal y c) región mamilar (ver figura 1.2) (6,7,8).

En el hipotálamo, a pesar de que existen un gran número de elementos celulares, fundamentalmente es posible diferenciar tres núcleos celulares: a) paraventricular, b) supraventricular y c) ventromedial.

En el hipotálamo ventral, se encuentra la llamada zona hipofisiotrófica, que es el lugar en donde se localizan las neuronas encargadas de producir las neurohormonas que a su vez regulan la función adenohipofisaria. En esta zona se encuentran los cuerpos celulares de dichas neuronas, pues sus axones terminan en la eminencia media. Sin embargo, uno de los aspectos más relevantes de esta zona, se refiere a la conexión del hipotálamo con la adenohipófisi. A nivel de la emi-

nencia media existe una red vascular muy importante con gran cantidad de vasos capilares, lo cual da como resultado al sistema porta, que dirigiéndose hacia abajo alcanza a la adenohipófisis(9).

El hipotálamo está conectado por otro lado con los centros nerviosos superiores, lo cual hace que se vea afectada su función por impulsos corticales y por otras estructuras.

El hipotálamo también se encuentra directamente conectado con la porción posterior de la hipófisi(neurohipófisis), que no es más que una proyección neural del piso del diencefalo; esta conexión de tipo nervioso, se hace a través de los axones de las células que integran a los núcleos paraventriculares y supraópticos. Estos axones terminan en las células que almacenan y controlan la liberación de la vasopresina y la oxitocina(9).

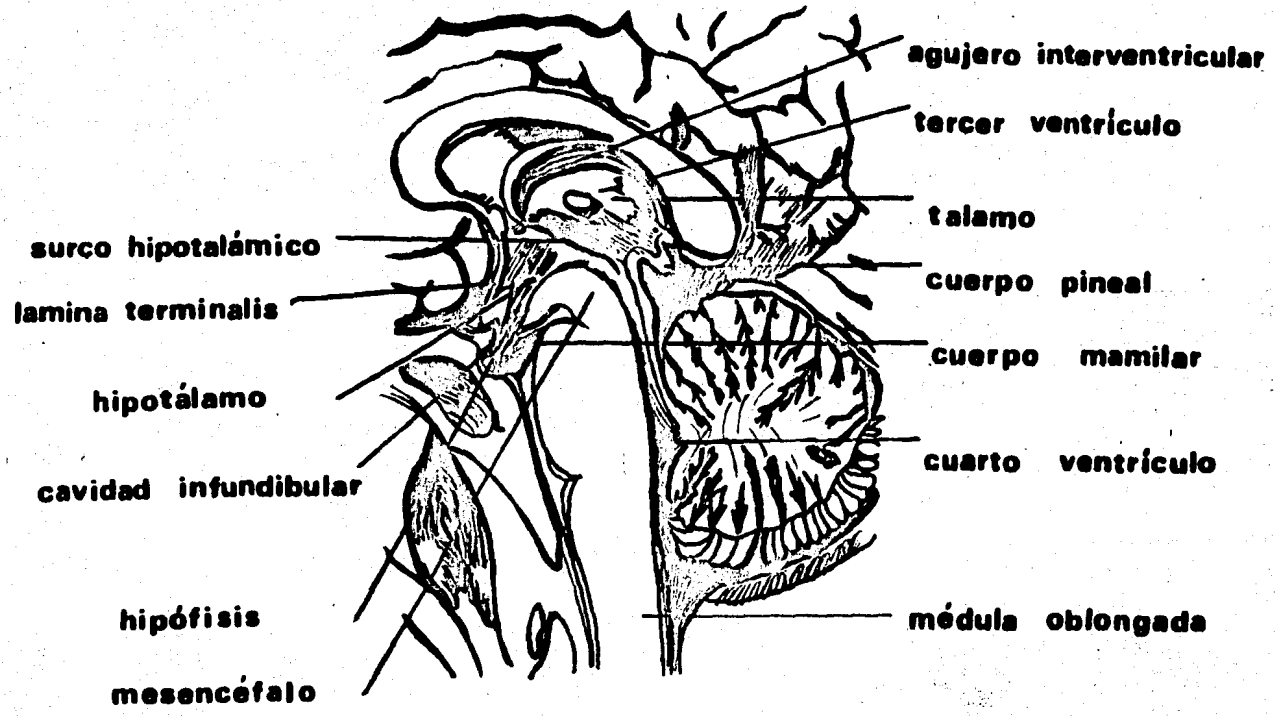


Figura 1.1

20

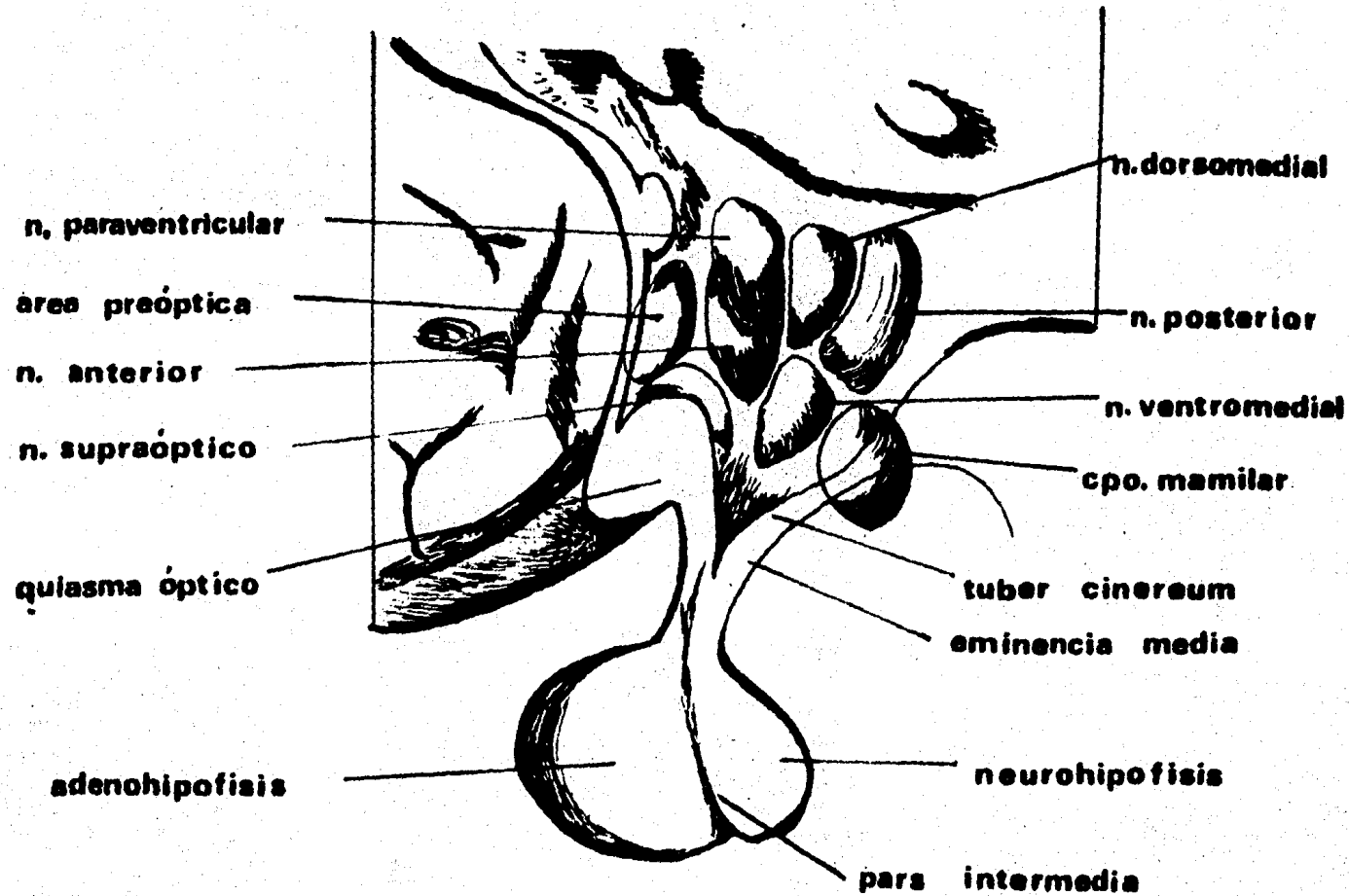


Figura 1.2

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Schally, A.V. Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. Its implications for the control of the reproductive processes. *Science* 202:18-28, 1978.
- 2.- Nikitovitch Winer, M.B. Hypothalamic gonadotropin releasing factors. En Gold, J.J. (editor). *Gynecologic Endocrinology*. Second edition. Harper and Row publishers, 1975. pp.3-14.
- 3.- Harris, G.W. Neural control of the pituitary gland. The Williams and Wilkins Co. 1955.
- 4.- Guillemin, R., R. Burgus. The hormones of the hypothalamus. *Sci. Amer.* 227:24-33, 1972.
- 5.- Guillemin, R. Peptides in the Brain: the new endocrinology of neuron. *Science* 202:390-402, 1978.
- 6.- Noback, C.R., R.J. Demares. Sistema nervioso humano. Fundamentos de neurobiología. McGraw Hill Co. México, 1980. pp. 253-265.
- 7.- Guyton, A.C. Textbook of Medical Physiology. Fifth Edition W.E. Saunders Co. Philadelphia, 1976. pp. 988-1003.
- 8.- Zárate, A., E.S. Canales, C. McGregor, L. Castelazo Ayala. *Endocrinología ginecológica y del embarazo*. Segunda edición. Prensa médica mexicana, 1982. pp.16-18.

CAPITULO 2

HIPOFISIS

La glándula pituitaria, también llamada hipófisis, en el humano, es una glándula pequeña y redonda que mide cerca de 1 cm. de diámetro y pesa alrededor de 0.5 g. Se encuentra en la llamada "silla turca" del hueso esfenooidal y está unida al hipotálamo por una estructura llamada tallo infundibular que atraviesa a la duramadre de la silla turca (ver figura 2.1).

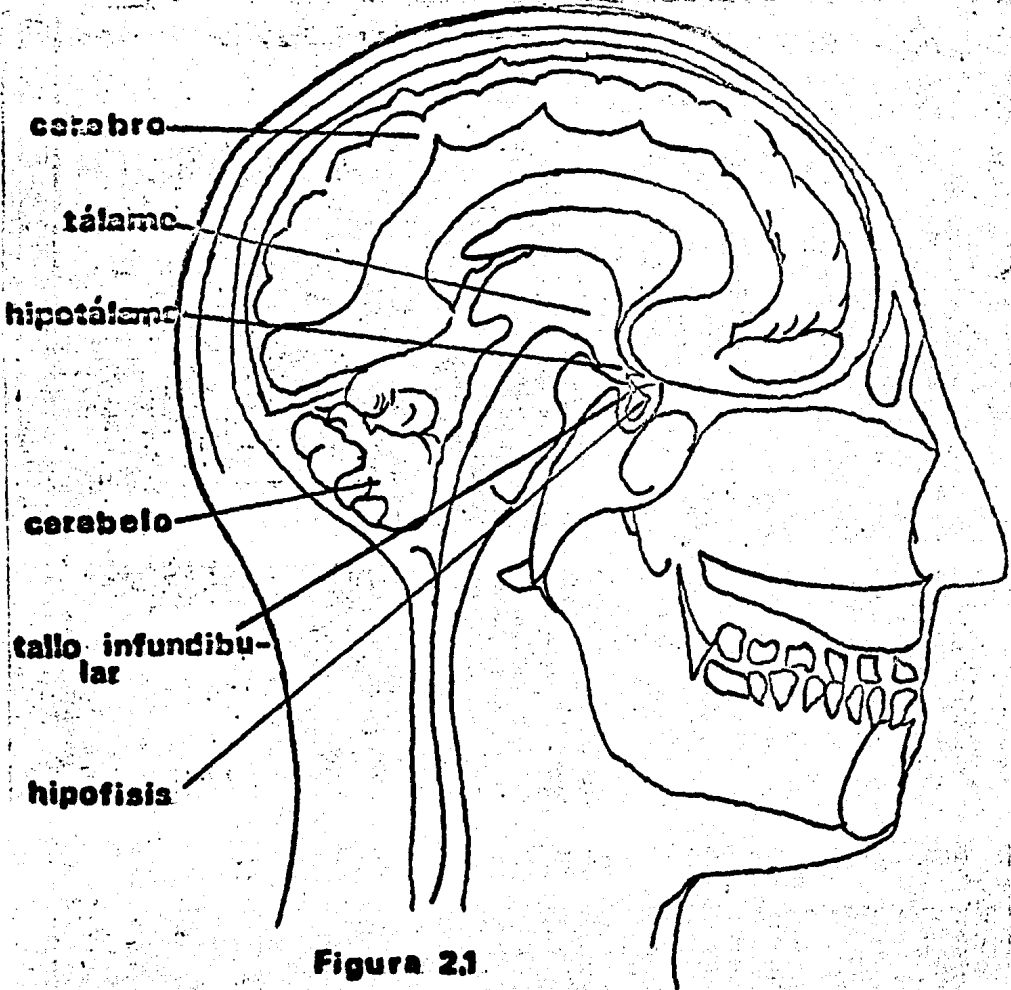


Figura 2.1

La hipófisis está dividida estructural y funcionalmente en los lóbulos anterior y posterior, ambos conectados al hipotálamo. El lóbulo anterior está formado por células epiteliales glandulares y está unida al hipotálamo por un sistema de vasos sanguíneos, llamado sistema porta hipotálamo-hipofisiario. A esta parte glandular de la hipófisis se le conoce como adenohipófisis o hipófisis anterior. El lóbulo posterior contiene neuronas que forman la parte neural de la hipófisis. Otras fibras nerviosas conectan a la neurohipófisis directamente con el hipotálamo. Esta sección neural recibe también el nombre de neurohipófisis o hipófisis posterior(1,2).

2.1. ADENOHIPOFISIS..

Esta glándula produce hormonas que regulan una amplia gama de actividades corporales, desde el crecimiento hasta la reproducción. La liberación de estas hormonas es estimulada e inhibida por sustancias que proceden del hipotálamo (como fue mencionado en el capítulo anterior). Las secreciones hipotalámicas son llevadas a la adenohipófisis de la siguiente manera: el hipotálamo está precisamente encima del tallo infundibular el cual recibe su aporte sanguíneo a través de la arteria hipofisiaria superior; tan pronto como las arterias llegan al tallo infundibular, se dividen en una red de capilares que se

unen para formar el sistema porta, encargado de recibir las secreciones hipotalámicas y transportarlas hasta el lóbulo anterior de la hipófisis (ver figura 2.2) (3,4,5,6,7).

Cuando el lóbulo anterior recibe la estimulación hormonal adecuada proveniente del hipotálamo, sus células glandulares liberan cualquiera de sus seis hormonas más importantes: 1) hormona del crecimiento (GH), 2) adrenocorticotrofina (ACTH), 3) hormona tirotrófina (TRH), 4) prolactina (PRL), 5) hormona folículo estimulante (FSH) y 6) hormona luteinizante (LH) (1,8).

Las células glandulares se clasifican en acidófilas, basófilas y cromóforas, dependiendo de la manera en como el citoplasma reacciona con los colorantes. Las acidófilas, se colorean en rosado y secretan dos hormonas: la GH, que controla el crecimiento corporal y la PRL, que inicia la secreción láctea en las glándulas mamarias. Las células basófilas se colorean de oscuro y se encargan de liberar las otras cuatro hormonas restantes: la TRH, que controla a la glándula tiroidea; la ACTH, que regula a las glándulas suprarrenales; la FSH, que favorece el desarrollo del óvulo y el espermatozoide en los órganos reproductivos y la LH, que estimula la secreción de esteroides sexuales, así como de provocar la inducción de la ovulación del folículo maduro.

2.2 NEUROHIPOFISIS.

En un sentido estricto, el lóbulo posterior o neurohipófisis no es una glándula endócrina, pues no tiene la capacidad de sintetizar a las hormonas que secreta,

Del hipotálamo hacia abajo en el tallo infundibular, en dirección al lóbulo posterior, se encuentran neuronas vitales para el funcionamiento de la neurohipófisis (ver figura 2.2) (1,2). El hipotálamo ventral produce dos hormonas: la oxitocina y la vasopresina. Estas hormonas se desplazan a lo largo de la superficie exterior de las neuronas del lóbulo posterior, donde se almacenan. Más tarde, cuando el hipotálamo es estimulado apropiadamente, envía impulsos que estimulan a la neurohipófisis provocando la liberación de las hormonas al sistema vascular periférico (1,2,8).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Guyton, A.C. Textbook of Medical Physiology. Fifth edition
W.B. Sanders Co. Philadelphia, 1976, pp.998-1003.
- 2.- Tortora, G.J., N.P. Anagnostakos. Principio de anatomía y fisiología. Harla, S.A. de C.V., México, 1977. pp.248-250, 257.
- 3.- Guillemin, R. Peptides in the Brain. The new endocrinology of the neuron. Science 202:390-402, 1978.
- 4.- Schally, A.V. Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. Its implications for the control of reproductive processes. Science 202:18-28, 1973.
- 5.- Zárate, A., E.S. Canales, C. McGregor, L. Castelazo Ayala. Endocrinología ginecológica y del embarazo. Segunda edición. Prensa mexicana, 1982, pp.16-18.
- 6.- McCann, S.M. Luteinizing hormone releasing hormone. N. Eng. J. Med. 294:797-802, 1977.
- 7.- Guillemin, R., R. Burgus. The hormones of the hypothalamus. Sci. Amer. 227:24-33, 1972.
- 8.- White, A., P. Handler, E.L. Smith. Principles of biochemistry. McGraw-Hill. N.Y. 5th ed. 1973

CAPITULO 3

ESTRUCTURA QUIMICA DE LA GnRH(LHRH) Y ANALOGOS.

Basándose en evidencias anatómicas y fisiológicas obtenidas durante los años de 1930 a 1955, Geoffrey Harris(1-3), fue el primero en sugerir que el hipotálamo controlaba las funciones de la glándula pituitaria por medio de sustancias reguladoras liberadas al sistema sanguíneo porta, que fluye del hipotálamo a dicha glándula(4-17). Estas evidencias resultaron de experimentos en los que: a) estímulos eléctricos en el hipotálamo produjeron la ovulación en la coneja(18) y en la rata(19); b) lesiones hipotalámicas(4) o cortes al tallo infundibular(18) ocasionando que la conexión entre el hipotálamo y la hipófisis quedase suspendida y con ello una pérdida de funcionalidad de dicha glándula; c) otro grupo de investigadores se dedicó a realizar trasplantes de la hipófisis lejos de su lugar de origen(rinón, ojo, etc)(20) y descubrieron que ésta perdía su capacidad para liberar gonadotrofinas, pero no la de secretar continuamente prolactina(21) durante períodos largos. Ellos mismos descubrieron que cuando estos autotrasplantes eran restituidos a su lugar de origen, recobraban su capacidad de secretar gonadotrofinas(Gntr) y de regular la producción y liberación de PRL(22). Estas observaciones sirvieron para reafirmar la idea de que el hipotálamo era el encargado de regu-

lar a la glándula hipófisis.

Tomando como base estas primeras observaciones, muchos investigadores procedieron a realizar experimentos más específicos y convincentes dirigidos a confirmar dicha teoría(29-30,32,33,34,36-37).

Guillemin(23), fué uno de los primeros en realizar experimentos in vitro utilizando extractos hipotalámicos que eran adicionados a cultivos de tejido hipofisiario para ver si estos cultivos eran capaces de liberar gonadotrofinas al ser estimulados por algún factor químico presente en los primeros. Al principio los resultados positivos de estos experimentos fueron puestos en duda, pues se llegó a creer que los extractos podían estar contaminados con LH y FSH. Realizando experimentos más concluyentes, el mismo investigador junto con A. V.Schally(24) demostraron que el hipotálamo contenía un factor químico desconocido que estimulaba a las células de la adenohipófisis para producir(o liberar solamente) la hormona luteinizante. Ellos observaron además que este factor era diferente a varios neurotransmisores conocidos, como la epinefrina, la serotonina, la norepinefrina y, a diferencia de lo reportado por Martini, et.al.(25), también era diferente a las hormonas secretadas por la neurohipófisis: vasopresina y oxitocina. La importancia de estas últimas aseveraciones reside

en el hecho de que se conocía que el hipotálamo contenía pequeñas cantidades de las sustancias mencionadas, además de otras como la adrenocorticotrofina, etc.(26,27).

Uno de los primeros métodos utilizados para evaluar la liberación de hormona luteinizante(LH), fué basado en sus efectos, es decir, por la inducción de la ovulación(6). Posteriormente Parlow(28), descubrió un método altamente específico para evaluar la actividad de la LH basandose en la capacidad de la LH de disminuir la concentración del ácido ascórbico ovárico en ratas prematuras pretratadas con gonadotrofinas (prueba que será mencionada de aquí en adelante con las siglas OAAD, que es la abreviatura de su nombre en inglés: ovarian ascorbic acid depletion).

Utilizando la técnica de la inducción de la ovulación, investigadores como Campbell y otros(29), reportaron que extractos ácidos del hipotálamo, inoculados directa y lentamente en el interior de la glándula hipófisis de conejos, inducía la ovulación como resultado de la estimulación de la secreción de LH. Nikitovitch *W. et. al.*(30) usando la técnica del OAAD obtuvo los mismos resultados en ratas. Estos últimos investigadores también concluyeron que los extractos que ellos usaron no pudieron inducir la ovulación cuando fueron inyectados al sistema circulatorio, debido a que por esta vía se

requieren dosis mucho más altas que las administradas directamente a la hipófisis. Esto se explicaba en base a que la concentración en los extractos del factor químico liberador de la LH (llamado al principio LHRF o LRF) era muy baja y, por lo tanto, no alcanzaba a liberar la cantidad suficiente de LH para inducir la ovulación. Fue por esto que McCann y colaboradores (30), para demostrar la secreción de LH estimulada por el LRF de los extractos hipotalámicos administrados por vía endovenosa, tuvieron que utilizar la prueba del OAAD. Estos resultados fueron corroborados en el laboratorio de Guillemin (5) usando extractos ácidos hipotalámicos. Empleando estos extractos, se logró inducir la ovulación en animales a los que se les había inhibido la secreción cíclica de LH espontánea, al haberles administrado testosterona en sus primeros días de vida (9, 19, 31).

Fueron McCann y Taleisnik (32) los primeros en descubrir que las ratas ovariectomizadas pretratadas con estrógenos, eran muy sensibles a los extractos ácidos de la eminencia media, pues se lograba inducir niveles plasmáticos considerablemente altos de LH, la cuál era determinada por la prueba del OAAD. Estos resultados fueron todavía mejorados por ellos mismos al tratar a las ratas con progesterona y estrógenos (33), lográndose desarrollar con todo esto la prueba más sensible

para determinar LH plasmático, utilizada en casi todas las investigaciones realizadas antes del advenimiento del radioinmunoanálisis (RIA) (34,35). Estos mismos autores informaron que los extractos de eminencia media no eran activos en ratas hipofisectomizadas y que, la sensibilidad de estos animales era similar a la encontrada en animales normales (36,37). Los resultados obtenidos fueron muy importantes, pues informaban que los extractos por sí solos no actuaban en forma semejante a la LH dando positiva la prueba del OAD, ya sea porque contuvieran sustancias con actividad a la LH o bien estuvieran contaminados con LH (38,39).

Las bases para postular que el hipotálamo también controlaba la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH), se obtuvieron de las mismas observaciones mencionadas para el caso de la LH (4-6,13,30,32,33,36,37). La primera demostración de actividad liberadora de FSH en extractos hipotalámicos de rata fue hecha por Igarashi y McCann in vivo (40), y por Mittler y Meites in vitro (41). Al factor químico al que se le acreditaba esta actividad se le llamó en un principio factor liberador de la hormona folículo estimulante (FSHRF).

Los estudios sobre la existencia de algún factor liberador de FSH se vieron retrasados, ya que, en esa época, no existía metodología específica, sensible y confiable para la

determinación de FSH.

Steelman y Pohley, fueron los primeros en desarrollar una técnica basada en el sinergismo existente entre la FSH y la hormona gonadotrófica coriónica(hCG) para provocar un aumento considerable en el peso ovárico de ratas. Posteriormente, Brown, desarrolló una técnica similar usando la misma respuesta ovárica pero en ratón(40,41).

Mittler y Meites(41), usando cultivos de tejido hipofisario, seguido por la determinación de FSH por el método de Steelman y Pohley, reportaron actividad liberadora de FSH en extractos ácidos hipotalámicos. Estos resultados indicaban la presencia, de un factor químico encargado de estimular la secreción (y/o síntesis) de FSH en la hipófisis y que era diferente del LRF. Estos resultados fueron puestos en duda(5), debido a que los métodos utilizados no eran lo suficientemente sensibles, ni específicos, como para asegurar que tal factor existía realmente. Las evidencias descritas por Igarashi y McCann(42,43) se basaban en un método in vivo, desarrollado por ellos mismos que tenía como fundamento el aumento en el peso uterino de la hembra de ratones y ratas, como resultado de la acción conjunta de la FSH y la hCG. Ellos inoculaban, por vía endovenosa, a las ratas ovariectomizadas, pretratadas con estrógenos y progesterona, extractos ácidos de fragmentos hipotalámicos -

de ratas machos adultas y observaron que se producía en las hembras de dichos animales un aumento de la FSH circulante, pues al ser inoculado subcutáneamente el plasma de estos últimos en ratones hembra se estimulaba un aumento perceptible en el peso uterino. Posteriormente, A.V.Schally y colaboradores(4,44,45) desarrollaron nuevos sistemas para probar la actividad del FSH-RH, basados en la disminución del contenido de la FSH hipofisiaria en ratas ovariectomizadas con o sin pretratamiento con estrógenos y progesterona, y, en ratas macho castradas y pretratadas con propionato de testosterona.

3.1. PURIFICACION DE LA GnRH.

Inicialmente se pensó que la actividad de la LH-RH y la FSH-RH eran actividad de dos sustancias diferentes, por lo que muchos investigadores se dieron a la tarea de aislar y purificar dos factores hipotalámicos diferentes.

Los procedimientos de purificación tanto para la LH-RH (46) como para la FSH-RH(47) fueron comunes en casi la totalidad de los pasos, con excepción de los últimos, en los cuáles, supuestamente se lograba la separación de las dos actividades(4). Posteriormente se verá que el anuncio del aislamiento de estos dos factores, como dos sustancias diferentes, fué erróneo debido a una mala interpretación de los resultados de

Los experimentos que a continuación se describirán.

El siguiente procedimiento de purificación fue llevado a cabo por el grupo de Schally en su totalidad. En cada uno de los pasos de purificación, la actividad de LHRH, era evaluada siguiendo la elevación de LH en ratas ovariectomizadas pretratadas con estrógenos y progesterona(48). En esos días la LH ya era medida por bioensayo y radioinmunoanálisis(RIA)(49,54). La actividad de la FSHRH era determinada in vitro midiendo la liberación de FSH de pituitaria de ratas. La FSH liberada era evaluada ya sea por el método de Steelman-Pohley, o bien por radioinmunoanálisis. Además, en 1965 fue postulado otro método para evaluar la actividad de la LHRH, midiendo la liberación in vivo de progestinas del ovario de conejo, utilizando extractos ácidos de varias partes de cerebro de conejo(49).

El primero de los doce pasos de purificación, consistió en obtener fragmentos hipotalámicos conteniendo al tallo infundibular hipofisiario y la eminencia media de animales recién decapitados(20 a 30 minutos). Estos fragmentos eran primero pulverizados sobre hielo seco, liofilizados y desengrasados con ácido acético 2N, a 8 °C(4,42,47,48,49,50,51,52). Estos extractos ácidos fueron calentados a ebullición y enfriados rápidamente para inactivar a las enzimas proteolíticas y las gonadotropinas contaminantes del material en estudio. Ya

liofilizados éstos, se reextrajeron con ácido acético glacial y se liofilizaron de nuevo. En esta fase, los extractos contenían aún otros factores hipotalámicos: TRH, LH-RH, FSH-RH, CRH, etc. (ver figura 3.1). Este último liofilizado fue sometido a filtración en gel (53) en una columna de sephadex G-25 (54), en porciones de 45 a 70 gramos, y utilizando como eluyente ácido acético 1M (en porcinos) o acetato de piridina 0.1M (en bovinos) 1 molar y 0.1 molar respectivamente (4)

Las fracciones obtenidas en este paso, que contenían la actividad de LH-RH y FSH-RH, emergieron entre las zonas de la alfa MSH (melanocyte stimulating hormone) y la lisin-vasopresina (54). El liofilizado de estas áreas fue concentrado y se le extrajeron las sales residuales con fenol (55,56). El extracto fue sometido a cromatografía de intercambio iónico, en una columna de carboximetilcelulosa (CMC). Para poder eluir las dos actividades requeridas fue necesario aplicar un gradiente a pH 7 de acetato de amonio 0.1M. Las fracciones así obtenidas volvieron a liofilizarse y a recromatografiarse en una columna analítica de CMC, y las fracciones con actividad fueron combinadas y liofilizadas. Posteriormente, se aplicó una electroforesis de flujo libre y se sometieron a una distribución a contracorriente a 500 transferencias. Este procedimiento separó a la LH-RH de trazas de lisin-vasopresina. La puri-

	peso	DOSIS MINIMA EFECTIVA PARA LIBERAR LH IN VIVO	DOSIS MINIMA EFECTIVA PARA LIBERAR FSH IN VIVO
1 ^{er} . liofilizado	1075 g.	-----	-----
2 ^o . liofilizado	665 g.	-----	-----
3 ^{er} . liofilizado	380 g.	125 - 500 μ g.	500 - 600 μ g.
4 ^o . liofilizado	83 g.	30 - 150 μ g.	100 μ g
5 ^o . liofilizado	940 mg.	-----	-----
6 ^o . liofilizado	277 mg.	0.1 μ g.	0.5 μ g.
7 ^o . liofilizado	94 mg.	50 ng.	0.3 μ g.
8 ^o . liofilizado	14.2mg.	2 - 25 ng.	10 - 30 ng.
9 ^o . liofilizado	8.9mg.	-----	-----
10 ^o . liofilizado	3.6mg.	-----	-----
11 ^o . liofilizado	2.3mg.	-----	-----
12 ^o . liofilizado	830 μ g.	-----	-----

Tabla 3.1 Relación de actividad liberadora de gonadotropinas en cada uno de los pasos de purificación llevados a cabo. Véase texto para mayor información.

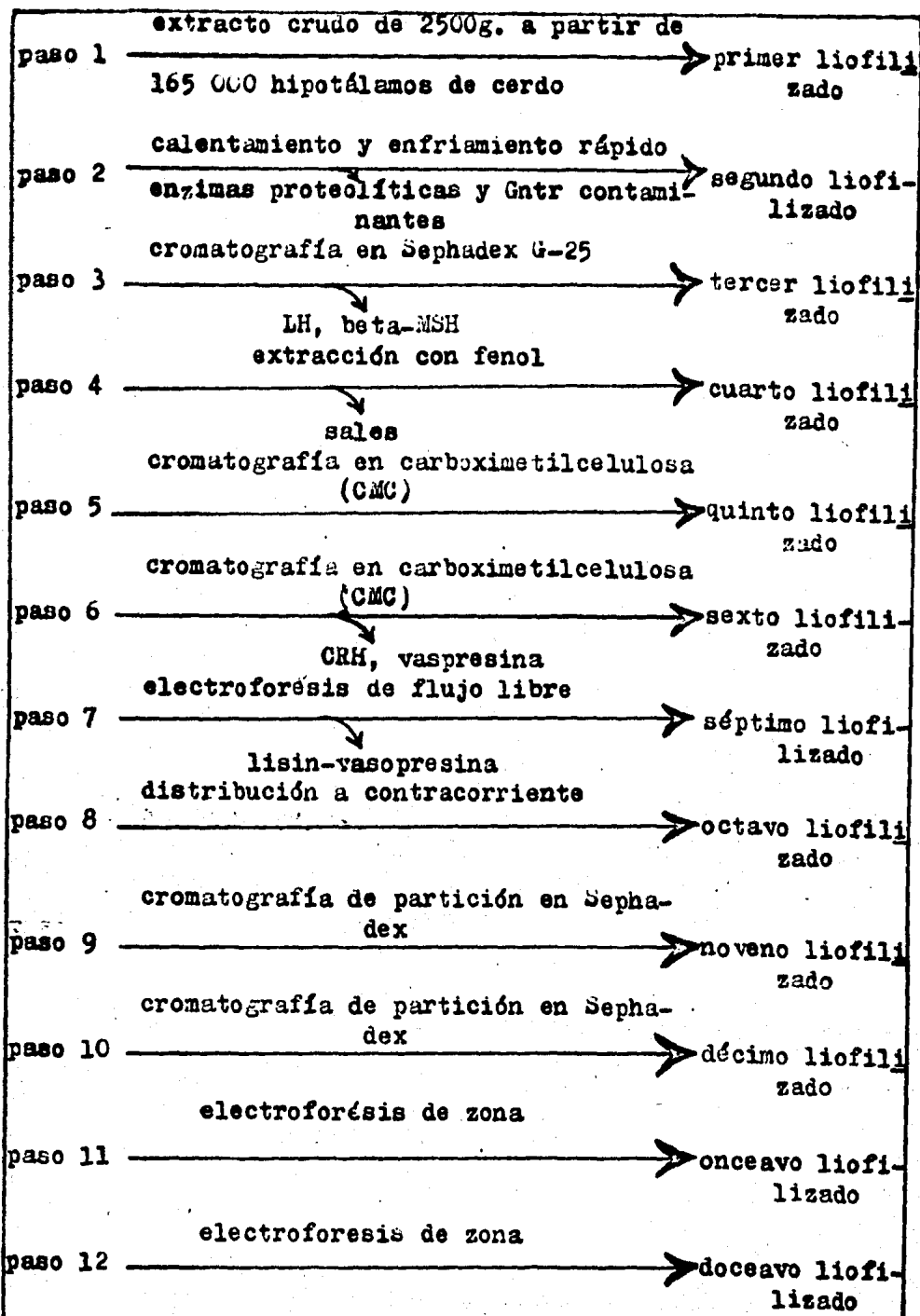


Figura 3.1. Diagrama esquemático de purificación de LHRH.

ficación fue continuada con 8.9mg., que fueron sometidos a una cromatografía de partición, utilizando otros sistemas de disolventes y obteniéndose una fracción activa de 2.3mg. (ver tabla 3.1).

El paso final de la purificación, fue una electroforésis de zona obteniendo un liofilizado de 830 microgramos, el cual contenía tanto la actividad de la LH-RH como la de la FSH-RH. (54).

3.2 DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA QUIMICA DE LA LH-RH.

En la misma época se logró purificar un material extraído de tejido cerebral humano que contenía actividad de la LH-RH y FSH-RH, mediante procedimientos similares a los descritos anteriormente, llegándose a la conclusión de que estos materiales eran químicamente muy semejantes a los obtenidos a partir de porcinos y bovinos(58). Con estudios llevados a cabo en otras especies, se concluyó, que esta sustancia liberadora de LH y de FSH, no era específica de especie.

Para determinar la estructura, del extracto puro se sometió a una hidrólisis ácida con HCl 6N por 20 horas a 110 °C. El resultado de la hidrólisis fue la siguiente composición aminoácida: His(1), Arg(1), Ser(1), Glu(1), Pro(1), Gly(2), Leu(1) y Tyr(1)(54) y poco después fue corroborado por el grupo de Gui-

llemin(57).

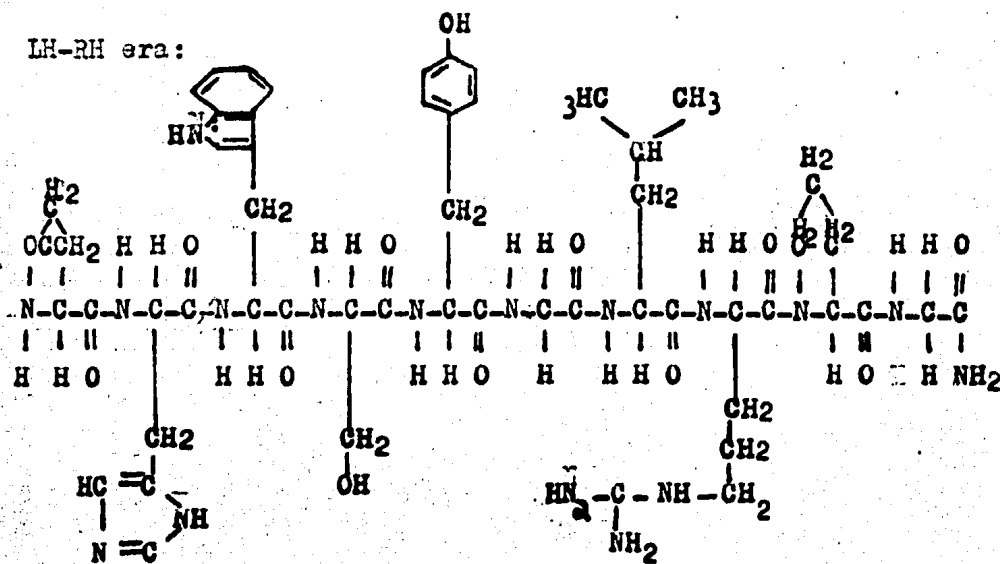
El material altamente purificado, fue sometido a la acción de enzimas proteolíticas(59), observándose que las actividades de la LH-RH y de la FSH-RH eran simultáneamente abolidas por la incubación con endopeptidasas como la quimotripsina, la papaína, la subtilisina y la termolisina(54,60), pero no por exopeptidasas como la leucin-aminopeptidasa y las carboxipeptidasas A y B. Estas últimas observaciones, aunadas a la incapacidad de definir al amino-terminal por el proceso de Edman y Dansyl, indujeron a pensar, que este aminoácido, estaba bloqueado. La inactivación producida por la pirrolidin-carboxipeptidasa(61), sugirió que el aminoácido N-terminal, estaba ocupado por el ácido piroglutámico.

Al principio se creyó que la estructura química de estos dos factores era la de un nonapéptido. Pero, cuando se llevó a cabo una hidrólisis alcalina en presencia del ácido tioglicólico(58,62,66), se llegó a la conclusión de que en la hidrólisis se estaba perdiendo un residuo de triptofano que vino a convertir a este polipeptido en un decapeptido.

Schally y colaboradores(63) llevaron a cabo la digestión proteolítica de la LH-RH, primero con quimotripsina y después con termolisina. Todos los péptidos obtenidos en las dos digestiones fueron sometidos a análisis secuencial. Los resi-

dos N-terminales , fueron determinados por el método de Dan silación y sometidos a degradación progresiva por el método de Edman.La determinación del residuo carboxi-terminal fue realizado por el método de la trititación selectiva desarrollado por Matsuo y Nair(56,64).

En base al análisis secuencial mencionado anteriormente, se llegó a la conclusión de que la estructura química de la LH-RH era:



Esta estructura, fue posteriormente confirmada por los mismos autores, utilizando un análisis secuencial convencional, el cual dió todavía más información, que reforzó la idea de que el aminoácido C-terminal estaba bloqueado por un grupo amido(65). Poco después de este anuncio, Guillemin y colaboradores , concluyeron que la estructura de la molécula de la LH RH en ovinos era la misma que la que se había anunciado para porcinos por el grupo de Schally(57,67).

Posteriormente a los descubrimientos de estos 2 grupos, se vino un alud de publicaciones que confirmaban la certeza de los enunciados postulados por los investigadores mencionados(68,69,70,71,72,73,79).

En vista de la pureza relativa y la ausencia de toxicidad del LH-RH porcino, fue probado éste, en humanos observándose que estimulaba la liberación tanto de LH como de FSH, reforzándose con ello la idea de que sólo existía un factor liberador para la LH y la FSH. Estas pruebas se realizaron tanto en hombres como en mujeres, bajo diferentes condiciones fisiológicas(66,67,68,74,75,76,98).

3.3 SINTESIS DE LH-RH Y SUS ANALOGOS.

El desarrollo de nuevos anticonceptivos basados en la LH-RH fué uno de los objetivos principales, incluso antes de ser caracterizada esta molécula en 1971. Tan pronto como la clave de su estructura fué descubierta, muchos esfuerzos se dirigieron hacia la síntesis de LH-RH y de sus análogos(87,88,89,90), que funcionaran tanto como agonistas o antagonistas.

Gracias a la disponibilidad del método de fase sólida, para la síntesis de péptidos, introducida por Merrifield(73,79,80). la síntesis de estos péptidos fue llevada a cabo por varios laboratorios(73,74,85).

El uso de instrumentos automáticos, con resinas sólidas (resinas de bencidrilaminas) para síntesis peptídica y de métodos de purificación como la distribución a contracorriente y cromatografía de líquidos a alta presión, hicieron posible la síntesis de grandes cantidades de LH-RH y análogos de la misma molécula. En la actualidad se han podido sintetizar más de 1000 análogos que han sido evaluados biológicamente(83,84).

Con la disponibilidad de grandes cantidades de LH-RH sintético, muchos laboratorios rápidamente se dieron a la tarea de estudiar su actividad, realizando pruebas in vitro e in vivo(92-97), primero en animales y después en humanos. Los resultados de estos experimentos dieron todavía más solidez a la teoría de que la molécula de LH-RH era la encargada de liberar tanto a la LH como a la FSH, pues se encontró que la LH-RH sintética estimulaba la liberación tanto de LH como de FSH en una proporción cuantitativamente muy similar a la observada con la LH-RH natural.

A primera instancia la molécula de LH-RH, parece resistente a la degradación o inactivación enzimática ya que posee un residuo piroglutámico que bloquea al grupo N-terminal, que lo protege de la degradación por carboxipeptidasas. En realidad, la molécula de LH-RH posee una vida media muy corta. Utilizando métodos enzimáticos se ha encontrado que en humanos

es de 4 minutos, no obstante que otros han propuesto mejor un rango de 4.5 a 9 minutos(77).

El primer sitio observado para la inactivación de la molécula de LH-RH es el que se encuentra a nivel del enlace glicina-leucina y que es roto por una enzima de origen cerebral(66,83,85,86). Otro de los sitios susceptibles, a la inactivación, es el enlace del grupo carboxilo terminal, en donde el residuo glicilamida es removido por una enzima que también inactiva a la oxitocina y a la vasopresina(86).

Como un esfuerzo para aumentar la resistencia de este péptido y bloquear su degradación enzimática, los químicos empezaron a introducir D-aminoácidos, observando que este tipo de inserción en la molécula de LH-RH era aceptado en la posición 6, sin reducción de la potencia; de hecho la potencia era aumentada, debido a la protección contra la degradación (91,99). En la actualidad, todos los agonistas y antagonistas potentes de la LH-RH tienen un D-aminoácido en esa posición.

El intercambio de un aminoácido L(natural) por uno de la serie D(no natural) particularmente en el centro de la molécula, produce un gran cambio conformacional; este cambio tiene un fuerte efecto en la forma de interacción de la hormona con sus receptores. Así la glicina que no posee cadenas laterales y por consiguiente, tampoco muestra actividad óptica, puede a

adoptar la conformación pseudoD o pseudoL y, en el caso especial y específico de la LH-RH, la glicina interacciona con el receptor en su conformación pseudoD, razón por la cual un D-aminoácido es aceptado en esta posición(83).

3.4. RELACION ENTRE LA ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD.

ANALOGOS DE LA LH-RH.

Muchas investigaciones han demostrado que los fragmentos de la LH-RH, tetra y tripeptidos-aminoterminales, así como los fragmentos octa y nonapeptidos carboxi-terminales, tienen muy poca o ninguna actividad. Así, no es posible la obtención de péptidos pequeños que sean activos(82).

En general, los aminoácidos en la posición 1, y de la 4 a la 10, parecen estar involucrados sólo en la interacción con el receptor y en proporcionar efectos conformacionales. Sin embargo, los residuos de His y Trp, parecen dar a la molécula efectos funcionales, además de proveerla de la capacidad para enlazarse o interaccionar con el receptor; pues sustituciones en las posiciones 2 o 3, disminuyen o anulan la actividad de la LH-RH(83,100).

Fujino y colaboradores(101,102) introdujeron una modificación en la molécula de LH-RH; la remoción del residuo de glicina terminal y su sustitución por una etilamina en el re-

siduo de la prolina. Esta modificación aumentó fuertemente la potencia de los agonistas potentes, mas no la de los antago--nistas. Actualmente, muchos agonistas potentes tienen un D-aminoácido en la posición 6 y la modificación de Fujino en la posición 10.

Posteriormente, se descubrió que la clave de la actividad intrínseca, era el residuo de histidina en la posición 2. La omisión de este residuo o bien su sustitución por otro aminoácido, dió como resultado compuestos análogos con actividad inhibitoria(100,107).

La inserción de aminoácidos aromáticos de la serie D en la posición 2, produjo antagonistas mucho más potentes(103) y como los primeros, con actividad in vivo(104,105,106). La potencia fue aumentando, conforme se descubrió que los residuos de las posiciones 1 y 3, podían adquirir también la configuración D, además de que el residuo piroglutámico en posición 1 podía ser sustituido por un aminoácido acilado, ya fuera D o L(83,108). La halogenación del residuo 2 en posición "para" también resultó favorable. Algunas de las siguientes modificaciones resultan ser las más favorables para producir efectos inhibitorios: N-acetil- Δ^3 Pro ó N-acrilil- Δ^3 Pro en posición 1; D-pCl-Phe y D-pF-Phe, en posición 2; D-Trp y \odot (2-naftil)D-Ala en posición 3 y 6.

Se ha intentado también sintetizar análogos de tipo cíclico, tanto agonistas como antagonistas, con sus modificaciones respectivas, dando como resultado péptidos con potencia muy baja(110).

También se han introducido compuestos sulfurados del tipo CH_2S , CH_3SO , CHCH_3S y CHCH_3SO , que poseen por lo menos un nuevo centro quiral, dándole a la molécula un efecto conformacional parecido al que produce la sustitución de un aminoácido L por uno de la serie D(91).

Mediante la introducción de un residuo de acilglicina en la posición 10, también se han obtenido una serie de antagonistas y agonistas potentes que se han probado in vivo e in vitro(111).

En base a lo descrito anteriormente, podemos decir que los agonistas son nonapéptidos con las siguientes características:

1.- Un D-aminoácido (37) en la posición 6, que de preferencia sea aromático e hidrofóbico, que llene las siguientes características:

a)estabilizar la estructura conformacional

b)exponer una entidad hidrofóbica capaz de interactuar con un receptor hidrofóbico através de interacciones

$\pi-\pi$.

2.- Un residuo de prolina etilamida terminal(87,101).

Los antagonistas sin embargo, como fué mencionado con anterioridad, tienen modificaciones que involucran a los tres aminoácidos que están cerca del N-terminal, dando como resultado compuestos con actividad intrínseca reducida, pero con alta afinidad de enlace.

Los análogos útiles como antagonistas serán:

1.- Los que tengan gran afinidad por los receptores de LH-RH, pero que interactúen de una manera en la que no se liberen LH y FSH.

2.- Que sean resistentes a la degradación in vivo(99).

3.- Los antagonistas más potentes poseen una secuencia(DX^{2,3},

⁶)-LH-RH, donde X es un aminoácido aromático(83).

4.- Sustitución del residuo 1 por aminoácidos acilados.

Hasta ahora se han logrado sintetizar cientos de análogos, que van desde los ligeramente potentes hasta los que son muchas veces más potentes que la LH-RH natural.

A continuación se presentan los agonistas y antagonistas más importantes(ver tablas 3.2 y 3.3).

actividad	NOMBRE Y ESTRUCTURA DEL ANALOGO	referencias
1.0	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-GlyNH ₂ LHRH	(2,7,34,68,69, 83)
2.5	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-NHCH ₂ CH ₃ (DesGly ¹⁰ -etilamida)LHRH	(22,101)
7.0	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-DAla-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂ (D-Ala ⁶)LHRH	(32,34-36,83,87, 112,114)
10.0	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-DPhe-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂ (D-Phe ⁶)LHRH	(35,114)
13.0	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-DTrp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂ (D-Trp ⁶)LHRH	(35,38,114,116)
15.0	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NHCH ₂ CH ₃ (desGly ¹⁰ , D-Leu ⁶ -etilamida)LHRH	(32,39,87,113)
17.0	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-DLis-Leu-Arg-Pro-NHCH ₂ CH ₃ (desGly ¹⁰ , D-Lis ⁶ -etilamida)LHRH	(32,87)
68.0	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-DTyr-Leu-Arg-Pro-NHCH ₂ CH ₃ (desGly ¹⁰ , D-Tyr ⁶ -etilamida)LHRH	(32,87)
144.0	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-DTrp-Leu-Arg-Pro-NHCH ₂ CH ₃ (DesGly ¹⁰ , D-Trp ⁶ -etilamida)LHRH	(32,35,38,87,114, 116)
200.0	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-DHis(im-Bzl)-Leu-Arg-Pro-NHCH ₂ CH ₃ (desGly ¹⁰ , D-His(im-Bzl)-etilamida)LHRH	(32,33,38,87,91, 116)
200.0	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-3(Tmp)Ala-Leu-Arg-Pro-NHCH ₂ CH ₃ (desGly ¹⁰ , D-3(Tmp)Ala ⁶ -etilamida)LHRH	(38,116)
190.0	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-3(2Nal)Ala-Leu-Arg-Pro-NHCH ₂ CH ₃ (desGly ¹⁰ , D-3(2Nal)Ala ⁶ -etilamida)LHRH	(38,116)
190.0	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-3(2Nal)Ala-NMLeu-Arg-Pro-NHCH ₂ - (desGly ¹⁰ , D-3(2Nal)Ala ⁶ , NMLeu ⁷ -etilamida) CH ₃	(38,40,115,116)

Tabla 3.2 Agonistas principales (de mayor potencia)

actividad in vivo: ratas que ovulan.	NOMBRE Y ESTRUCTURA DEL ANALOGO	referencia
0/10	D-pGlu-D-Phe-DTrp-Ser-Tyr-DTrp-Leu-arg-Pro-GlyNH ₂ (D-pGlu ¹ , D-Phe ² , D-Trp ^{3,6})LHRH dosis:250 μ g.	(88,89,91)
0/10	Ac Δ^3 Pro-4Cl-DPhe-DTrp-Ser-Tyr-DTrp-Leu-Arg-Pro-GlyNH ₂ (Ac Δ^3 Pro ¹ , 4ClD-Phe ² , D-Trp ^{3,6})LHRH dosis:7.5 μ g.	(87,88,91)
0/10	Ac Δ^3 Pro-4F-DPhe-DTrp-Ser-Tyr-DTrp-Leu-Arg-Pro-GlyNH ₂ (Ac Δ^3 Pro ¹ , 4F-DPhe ² , D-Trp ^{3,6})LHRH dosis:7.5 μ g.	(87,88,89, 91)
0/10	Ac Δ^3 Pro-4F-DPhe-(α (2-Nal)D-Ala-Ser-Tyr-DTrp-Leu-Arg-Pro-GlyNH ₂ (Ac Δ^3 Pro ¹ , 4F-DPhe ² , (α (2-Nal)DALA ³ , DTrp ⁶)LHRH dosis:5.0 μ g.	(87,88,89, 91)
3/10	dosis:2.5 μ g.	
0/10	Ac Δ^3 Pro-4F-DPhe-DTrp-Ser-Tyr-(α (2-Nal)DALa-Leu-Arg-Pro-GlyNH ₂ (Ac Δ^3 Pro ¹ , 4F-DPhe ² , D-Trp ³ , (α (2-Nal)DALa ⁶)LHRH dosis:5.0 μ g.	(87,88,89, 91)
2/10	dosis:2.5 μ g.	
0/10	Ac Δ^3 Pro-4F-DPhe-DTrp-Ser-Tyr-(α (2-Nal)DALa-Leu-Arg-Pro-GlyNH ₂ (Ac Δ^3 Pro ¹ , 4F-DPhe ² , (α (2-Nal)DALa ^{3,6})LHRH dosis:5.0 μ g.	(87,88,89, 91)
0/10	dosis:2.5 μ g.	

Tabla 3.3 Antagonistas más potentes

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Harris,G.W.,D.Jacobson. Functional grafts of the anterior pituitary gland. Proc.Roy.Soc. London, 139:263-269, 1952.
- 2.- Harris,G.W.,M.Reed,C.F.Fawcett. Hypothalamic releasing factors and the control of the pituitary gland. Brit.Med. Bull. 22:266-271, 1966.
- 3.- Harris,G.W. Neural control of pituitary gland. Edward Arnold. London, 1955.
- 4.- Schally,A.V.,A.Arimura,C.Y.Bowers,A.J.Kastin,S.Sawano,T.W.Redding. Hypothalamic neurohormones regulating anterior pituitary function. Recent.Prog.Horm.Res. 24:497-582,1968.
- 5.- Guillemin,R. Hypothalamic factors releasing pituitary hormones. Recent.Prog.Horm.Res. 20:89-130, 1964.
- 6.- McCann,S.M.,V.D.Ramírez. The neuroendocrine regulation of hypophyseal luteinizing hormone secretion. Recent.Prog.Horm. Res. 20:131-181, 1964.
- 7.- Burgos,R.,Guillemin,R. Hypothalamic releasing factors. Ann. Rev.Biochem. 39:499-526, 1970.
- 8.- Schally,A.V.,D.H.Coy,C.A.Meyers. Hypothalamic regulatory hormones. Ann.Rev.Biochem. 47:89-128, 1978.
- 9.- Barraclough,C.A. Modifications in the CNS regulation of reproduction after exposure of prepubertal rats to steroid hormones. Recent.Prog.Hormo.Res. 22:503-539, 1966.

- 10.- Amoss, M.S., R. Guillemin. The hypothalamus and the control of reproduction. En Gonadotropin Therapy in female infertility, editado por E. Rosenberg. Excerpta Medica, Amsterdam, 1973. pp.3-13.
- 11.- Guillemin, R. The expanding significance of hypothalamic peptides or is Endocrinology a branch of neuroendocrinology? Recent. Prog. Horm. Res. 33:1-28, 1977.
- 12.- Wilbur, J.E. Gonadotropin releasing hormone and TRH: distribution and effects in the central nervous system. Recent. Prog. Horm. Res. 32:117-159, 1976.
- 13.- McCann, S.M. Luteinizing hormone releasing hormone. N. Engl. J. Med. 296:797-802, 1977.
- 14.- Nikitovitch-Winer, M.B. Hypothalamic gonadotropin releasing factors. En Gynecologic Endocrinology, editado por J.J. Gold. Harper and Row publishers, 1975. pp.3-14.
- 15.- Martini, L., F. Franschini, M. Motta. Neural control of anterior pituitary functions. Recent. Prog. Horm. Res. 24:439-496, 1968.
- 16.- Reichlin, S. Hypothalamic pituitary function. En Endocrinology, editado por R.O. Scow. Excerpta Medica Amsterdam, 1973, pp. 1-16.
- 17.- Schally, A.V., A. Arimura, A.J. Kastin. The LH and FSH releasing hormone. En Endocrinology, editado por R.O. Scow. Excerpt

ta Medica Amsterdam, 1973, pp. 93-97.

- 18.- Nikitovitch-Winer, M.B. Induction of ovulation in rats by direct intrapituitary infusion of median eminence extracts. *Endocrinology* 70:350-358, 1962.
- 19.- Barraclough, C.A., R.A. Gorski. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen induced sterility in the female rat. *Endocrinology* 68:68-79, 1961.
- 20.- Everett, J.W. Functional corpora lutea maintained for months by autografts of rat hypophysis. *Endocrinology* 58:786-796, 1956.
- 21.- Nikitovitch-Winer, M. Comparative study of luteotropin secretion by hypophysial autotransplants in the rat. Effect of site and stages of the estrous cycle. *Endocrinology* 62:522-532, 1958.
- 22.- Nikitovitch-Winer, M. Functional restitution of pituitary grafts retransplanted from kidney to median eminence. *Endocrinology* 63:916-930, 1958.
- 23.- Guillemin, R., B. Rosenberg. Humoral hypothalamic control of anterior pituitary : a study with combined tissue cultures. *Endocrinology* 57:599-607, 1955.
- 24.- Guillemin, R., A.V. Schally. Reevaluation of a technique of pituitary incubation in vitro as an assay for corticotropin releasing factor. *Endocrinology* 65:555-562, 1959.

- 25.- Martini, L., L. Mira, A. Pecile, S. Saito. Neurohypophysial hormones and release of gonadotropins. *J. Endocrinol.* 18:245-250, 1959.
- 26.- Guillemin, R., A. V. Schally, H. S. Lipscomb, R. N. Andersen, J. M. Long. On the presence on the hog hypothalamus of beta-corticotropin releasing factor, alfa and beta melanocyte stimulating hormones adrenocorticotropin, lysine-vasopressin and oxytocin. *Endocrinology* 70:471-477, 1962.
- 27.- Schally, A. V., H. S. Lipscomb, J. M. Long, W. E. Dear, R. Guillemin. Chromatography and hormonal activities of dog hypothalamus. *Endocrinology* 70:478-480, 1962.
- 28.- Parlow, A. F. Biassay of pituitary LH by depletion of ovarian ascorbic acid. En Human pituitary gonadotropins, editado por A. Albert. Charles C. Thomas Springfield, 1961 pp. 300-310.
- 29.- Campbell, H. J., G. Feuer, G. W. Harris. The effect of intrapituitary infusion of median eminence and other brain extracts on anterior pituitary gonadotropin secretion. *J. Physiol.* 170:474-479, 1964.
- 30.- McCann, S. M., S. Taleisnik, H. M. Friedman. LH-releasing activity in hypothalamic extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104:432-434, 1960.
- 31.- Johnson, D. C. Hypophysial LH release in androgenized fe-

- male rats after administration of sheep brain extracts. *Endocrinology* 72:832-836, 1963.
- 32.- McCann, S.M., S. Taleisnik. The effect of a hypothalamic extract on the plasma luteinizing hormone (LH) activity of estrogenized ovariectomized rat. *Endocrinology* 68:1071-1075, 1961.
- 33.- Ramirez, V.D., S.M. McCann. A highly sensitive test for LH-releasing activity: the ovariectomized, estrogen progesterone-blocked rat. *Endocrinology* 73:193-198, 1963.
- 34.- Yalow, R.S. Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biological systems. Nobel Lectures. *Science* 200:1236-1245, 1978.
- 35.- Rosemberg, E.G., G. Bulat. Immunoassay of human gonadotropins. En *Gonadotropin therapy in female infertility*, editado por E. Rosemberg. Excerpta Medica Amsterdam, 1973. pp. 97-106.
- 36.- Ramirez, D., S.M. McCann. Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature rats. *Endocrinology* 72:452-464, 1963.
- 37.- McCann, S.M., P.S. Kalra, S.P. Kalra, K. Ajika, C. Libertun, K.J. Cooper, C.P. Fawcett, L. Krulich. Control of adeno-hypophysial secretion by hypothalamic releasing and inhibiting neurohormones. En *Endocrinology*, editado por R.O. Scow. Excerpta

Medica Amsterdam, 1973. pp.107-111.

- 38.- Guillemin, R., E. Sakiz. Quantitative study of the response to LH after hypophysectomy in the ovarian ascorbic acid depletion test: effect of prolactin. *Endocrinology* 72:813-816, 1963.
- 39.- Ward, D. N., R. F. McGregor, J. D. Putch. Effect of chloretone on the ovarian ascorbic acid concentration in pseudopregnant rats as employed in the Parlow assay for luteinizing hormone. *Endocrinology* 71:474-478, 1962.
- 40.- Igarashi, M., S. M. McCann. A new sensitive bioassay for follicle stimulating hormone (FSH). *Endocrinology* 74:440-445, 1964.
- 41.- Mittler, J., C. J. Meites. In vitro stimulation of pituitary of follicle stimulating hormone release by hypothalamic extract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117:309:313, 1964.
- 42.- Igarashi, M., S. M. McCann. A hypothalamic follicle stimulating hormone releasing factor. *Endocrinology* 74:446-452, 1964.
- 43.- Igarashi, M., R. Nallar, S. M. McCann. Further studies on the follicle stimulating hormone releasing action of hypothalamic extracts. *Endocrinology* 75:901-907, 1964.
- 44.- Kuroshima, A., Y. Ishida, C. B. Bowers, A. V. Schally. Stimulation of release of follicle stimulating hormone by hypothala-

mic extracts in vitro and in vivo. *Endocrinology* 76:614:619, 1965.

- 45.- Kuroshima, A., A. Arimura, T. Saito, Y. Ishida, C. B. Bowers, A. V. Schally. Depletion of pituitary follicle stimulating hormone levels by beef and pig hypothalamic extracts. *Endocrinology* 78:1105-1108, 1966.
- 46.- Schally, A. V., C. B. Bowers, W. P. White, A. I. Cohen. Purification and in vivo and in vitro studies with porcine luteinizing hormone releasing hormone. *Endocrinology* 81:77-87, 1967.
- 47.- Schally, A. V., T. Saito, A. Arimura, S. Sawano, C. B. Bowers, W. F. White, A. Cohen. Purification and in vivo and in vitro studies with porcine hypothalamic follicle stimulating hormone releasing (hormone) factor. *Endocrinology* 81:882-892, 1967.
- 48.- Schally, A. V., C. B. Bowers. Purification of luteinizing hormone releasing factor from bovine hypothalamus. *Endocrinology* 75:608-614, 1964.
- 49.- Endrőczi, E., J. Hilliard. Luteinizing hormone releasing activity in different parts of rabbit and dog brain. *Endocrinology* 77:667-673, 1965.
- 50.- Schally, A. V., E. E. Müller, A. Arimura, C. Y. Bowers, T. Saito, T. W. Redding, S. Sawano, P. Pizzolato. Releasing factors in human hypothalamic and neurohypophysial extracts. *J. Clin. Endocr.*

27:755-762, 1967.

- 51.- Schally, A.V., T.Saito, A.Arimura, E.E.Muller, C.B.Bowers.
Purification of follicle stimulating hormone releasing factor(FSHRF) from bovine hypothalamus. *Endocrinology* 79: 1087-1094, 1966.
- 52.- Schally, A.V., C.B.Bowers, T.M.Redding. Purification of thyrotropic hormone releasing hormone from bovine hypothalamus. *Endocrinology* 78:726-732, 1966.
- 53.- Porath, J., A.V.Schally. Gel filtration of posterior pituitary hormones. *Endocrinology* 70:738-742, 1962.
- 54.- Schally, A.V., A.Arimura, Y.Baba, R.M.G.Nair, H.Matsuo, T.M.Redding, L.Debeljuk, W.F.White. Isolation and properties of the FSH and LH releasing hormone. *Biochem.Biophys.Res. Comm.* 43:393-399, 1971.
- 55.- Schally, A.V., Y.Baba, R.M.G.Nair, C.D.Bennet. The amino acid sequence of a peptide growth hormone releasing activity isolated from porcine hypothalamus. *J.Biol.Chem.* 246:6647-6650, 1971.
- 56.- Schally, A.V., R.M.G.Nair, T.W.Redding, A.Arimura. Isolation of the LH and FSH releasing hormone from porcine hypothalamus. *J.Biol.Chem.* 246:7230-7234, 1971.
- 57.- Amoss, M., R.Burgos, R.Blackwell, W.Vale, R.Fellows, R.Guillemin. Purification amino acid composition and N-terminus

- of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRP) of ovine origin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 44:205-210, 1971.
- 58.- Schally, A.V., A. Arimura, C.B. Bowers, I. Wakabayashi, A.J. Kastin, T.W. Redding, J.C. Mittler, R.M.G. Nair, P. Pizzolato, A.J. Segal. Purification of hypothalamic releasing hormone of human origin. *J. Clin. Endocr. Metab.* 31:291-300, 1970.
- 59.- Schally, A.V., Y. Baba, A. Arimura, T.W. Redding, W.F. White. Evidence for peptide nature of LH and FSH releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 42:50-56, 1971.
- 60.- Currie, B.I., H. Sievertsson, C. Bogentoft, C.B. Bowers, R.F. Doolittle. Data on structure of bovine LRH by inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 42:1180-1184, 1971.
- 61.- Doolittle, R.F., R.W. Armentrout. Pyrrolidonyl peptidase. An enzyme for selective removal of pyrrolidonecarboxylic acid residues from polypeptides. *Biochemistry* 7:516-521, 1968.
- 62.- Mastubara, H., R.M. Sasaki. High recovery of tryptophan from acid hydrolysates of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 35:175-181, 1969.
- 63.- Matsuo, H., Y. Baba, R.M.G. Nair, A. Arimura, A.V. Schally. Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 43:1334-1339, 1971.

- 64.- Matsuo, H., Y. Fujimoto, T. Tatsumo. A novel method for the determination of C-terminal amino acid in polypeptides by selective tritium labelling. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 22:69-74, 1966.
- 65.- Baba, Y., H. Matsuo, A.V. Schally. Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 44:459-463, 1971.
- 66.- Schally, A.V., Y. Baba, T.M. Redding, H. Matsuo, A. Arimura. Further studies on the enzymatic and chemical inactivation of hypothalamic FSHRH. *Neuroendocrinology* 8:347-357, 1971.
- 67.- Burgus, R.M., Butcher, M., Amoss, N., Ling, M., Monahan, J., Rivier, R., Fellows, R., Blackwell, W., Vale, R., Guillemin, R. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69:278-282, 1972.
- 68.- Schally, A.V. Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. Its implications for the control of reproductive processes. *Science* 202:18-22, 1978.
- 69.- Guillemin, R. Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. *Science* 202:390-402, 1978.
- 70.- Schally, A.V., A. Arimura, A.J. Kastin. Hypothalamic regulatory hormones. *Science* 179: 341-350, 1973.
- 71.- Guillemin, R., R. Burgus. The hormones of the hypothalamus.

Scientific American 227(5):24-33, 1972.

- 72.- Schally, A.V., A. Arimura, A.J. Kastin, H. Matsuo, Y. Baba, T.W. Redding, R.M.G. Nair, L. Debeljuk, W.P. White. Gonadotropin releasing hormone polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle stimulating hormones. Science 173: 1036-1038, 1971.
- 73.- Amoss, M.S., R. Guillemin. The hypothalamus and the control of reproduction. En Gonadotropin therapy in female infertility, editado por E. Rosenberg. Excerpta Medica, 1973. pp. 3-14.
- 74.- Kastin, A.J., A.V. Schally, C. Gual, A.R. Midgley Jr., C.B. Bowers, F. Gomez-Perez. Administration of LH-releasing hormone to selected subjects. Am. J. Obst. Gynec. 108:177-182, 1970.
- 75.- Kastin, A.J., C. Gual, A.V. Schally. Clinical experience with hypothalamic hormones. P-2-Luteinizing hormone releasing hormone and other hypophysiotropic releasing hormones. Recent Prog. Horm. Res. 28:201-227, 1972.
- 76.- Soria, J., A. Zárate, E.S. Canales, A. Ayala, A.V. Schally, D.H. Coy, E.J. Coy, A.J. Kastin. Increased and prolonged LH-RH/FSH-RH activity of synthetic (D-Ala⁶, DesGly-NH₂)-LHRH ethylamide in normal women. Amer. J. Obstet. Gynec. 123:145-146, 1975.
- 77.- Redding, T.W., A.J. Kastin, D. Gonzalez, D.H. Coy, E.J. Coy, D.S. Schalch, A.V. Schally. The half life, metabolism and excre

tion of tritiated luteinizing hormone releasing hormone.
(LHRH) in man. *J.Clin.Endocr.Metab.* 37:626-631, 1973.

- 78.- Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. III. An improved synthesis of bradykinin. *Biochemistry* 3:1385-1389, 1964.
- 79.- Merrifield, R.B. New approaches to the chemical synthesis of peptides. *Recent.Prog.Horm.Res.* 23:451-482, 1967.
- 80.- Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J.Am.Chem.Soc.* 85:2149-2154, 1963.
- 81.- Matsuo, H., A. Arimura, R.M.G. Nair, A.V. Schally. Synthesis of the porcine LH and FSH releasing hormone by the solid phase method. *Biochem.Biophys, Res.Comm.* 45:822-827, 1971.
- 82.- Schally, A.V., A. Arimura, W.H. Carter, T.W. Redding, R. Geiger, W. König, H. Wissman, G. Jaeger, J. Sandow, N. Yanaihara, C. Yanaihara, T. Hashimoto, M. Sakagami. Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) activity of one synthetic polypeptides I. Fragments shorter than decapeptide. *Biochem.Biophys. Res. Comm.* 48:366-375, 1972.
- 83.- Stewart, J.M. Pharmacology of LHRH and analogs. In *LH-RH peptides as female and male contraceptives*, editado por G.I. Zatuchni, J.D. Shelton, J.J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp.2-12.

- 84.- Coy, D.H., A.V. Schally, L.A. Vilchez-Martinez, E.J. Coy, A. Arimura. Stimulators and inhibitory analogs of LH-RH. En Hypothalamic hormones, editado por M. Motta, P.G. Crosignani, L. Martini. Academic press, 1975. pp.1-12.
- 85.- Marks, N., F. Stern. Enzymatic mechanism for the inactivation of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH). Biochem. Biophys. Res. Comm 61:1458-1463, 1974.
- 86.- Koch, Y., Y. Baram, P. Chobsiang, M. Fridkin. Enzymic degradation of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) by hypothalamic tissue. Biochem. Biophys. Res. Comm. 61:95-103, 1974.
- 87.- Rivier, J., C. Rivier, M. Perrin, J. Porter, W.W. Vale. GnRH analogs: structure activity relationships. En LHRH peptides as female and male contraceptives, editado por G. Zatzuchni, J.D. Shelton, J.J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981 pp. 13-23.
- 88.- Coy, D.H., M.V. Nekola, J. Erche gyi, E.J. Coy, A.V. Schally. Contraceptives effects of recent potent LHRH antagonist analogs. En LHRH peptides as female and male contraceptives editado por Zatzuchni, J.D. Shelton, J.J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp.37-45.
- 89.- Bowers, C.B., F. Folkers, K. Friebel, W. Lutz, G.A. Reynolds, F. Mo many. A critique on analog antagonists of LHRH. En LHRH

peptides as a female and male contraceptives editado por Zatuschni, G., J.D. Shelton, J.J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp.46-62.

90.- Bowers, C.B. Discussion: Pharmacologic development of LHRH and analogs. En LHRH peptides as female and male contraceptives, editado por Zatuschni, G., J.D. Shelton, J.J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp.63-66.

91.- Spatola, A.F., A.L. Bettag, N.S. Agarwal, H. Saneii, W.W. Vale, C. B. Bowers. The role of the peptide backbone modifications in increasing biological stability of LHRH analogs. En LHRH peptides as female and male contraceptives, editado por Zatuschni, G., J.D. Shelton, J.J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp.24-36.

92.- Redding, T.M., A.V. Schally, A. Arimura, H. Matsuo. Stimulation of release and synthesis of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in tissue cultures of rats pituitaries in response to natural and synthetic LH and FSH releasing hormone. *Endocrinology* 90:764-770, 1972.

93.- Schally, A.V., T.M. Redding, H. Matsuo, A. Arimura. Stimulation of FSH and LH release in vitro by natural and synthetic LH and FSH releasing hormone. *Endocrinology* 90:1561-1568, 1972.

94.- Arimura, A., L. Debeljuk, A.V. Schally. Stimulation of FSH re-

- lease in vivo by prolonged infusion of synthetic LHRH.
Endocrinology 91:529-532, 1972.
- 95.- Debeljuk, L., A. Arimura, E.G. Rennels, A.V. Schally. Effects of chronic treatment with LH/FSH-RH in hypophysectomized pituitary grafted male rats. Endocrinology 92:921-930, 1973.
- 96.- Arimura, A.L. Debeljuk, M. Shiino, E.G. Rennels, A.V. Schally. Follicular stimulation by chronic treatment with synthetic LH releasing hormone in hypophysectomized female rats bearing pituitary grafts. Endocrinology 92:1507-1514, 1973.
- 97.- Faglia, G., P. Beck-Peccoz, P. Travaglini, A. Paracchi, A. Spada, A. Lewin. Elevations in plasma growth hormone concentrations after luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in patients with active acromegaly. J. Clin. Endocrinol. Metab. 37: 338-340. 1973.
- 98.- Schally, A.V., W.H. Carter, A.F. Parlow, M. Saito, A. Arimura, C.Y. Bowers, D.E. Holtkamp. Alterations of LH and FSH release in rats treated with clomiphene or its isomers. Amer. J. Obstet. Gynec. 107:1156-1167, 1970.
- 99.- Labrie, F., M. Savary, D.H. Coy, E.J. Coy, A.V. Schally. Inhibition of luteinizing release by analogs of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in vitro. Endocrinology 98: 289-294, 1976.
- 100.- Vale, W.W., G. Grant, J. Rivier, M. Monahan, M. Amoss, R. Blackwell,

R.Burgus,R.Guillemin. Synthetic polypeptide antagonists of hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone. Science 176:933-934, 1972.

101.-Fujino,M.,S.Kobayashi,M.Obayashi,T.Fukuda,S.Shinagawa,I. Yamazaki,R.Nakayama,W.F.White,R.H.Rippel. Structure-activity relationships in the C-terminal part of the luteinizing hormone-releasing hormone(LH-RH).Biochem.Biophys Res.Comm. 49:863-869, 1972.

102.-Fujino,M.,S.Shinagawa,M.Obayashi,S.Kobayashi,T.Fukuda,I. Yamazaki,R.Nakayama,W.F.White,R.Rippel, Further studies on the structure on the structure-activity relationships in the C-terminal part of luteinizing hormone releasing hormone. J.Med.Chem. 16:1144-1147, 1973.

103.-Rees,R.W.A.,T.J.Foell,S.Y.Yearl Chai,N.Grant. Synthesis and biological activities of analogs of the luteinizing hormone releasing hormone(LHRH) modified in position 2. J.Med.Chem. 17:1016-1019, 1974.

104.-Yardley,J.P.,T.J.Foell,C.W.Beattie,N.H.Grant. Antagonism of luteinizing hormone release and of ovulation by an analog of the luteinizing hormone releasing hormone.J.Med. Chem. 18:1244-1247, 1975.

105.-Corbin,A.,C.W.Beattie. Effect of luteinizing hormone releasing hormone(LHRH) and a LHRH antagonist on hypothala

- mic and plasma LHRH of hypophysectomized rats. *Endocrinology* 98:247-250, 1976.
- 106.-De la Cruz, A., D.H. Coy, J.A. Vilchez-Martínez, A. Arimura, A.V. Schally. Blockade of ovulation in rats by inhibitory analogs of luteinizing hormone releasing hormone. *Science* 191:195-197, 1976.
- 107.-Coy, D.H., J.A. Vilchez-Martínez, E.J. Coy, A. Arimura, A.V. Schally. A peptide inhibitor of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37:331-333, 1973.
- 108.-Rivier, J., M. Amoss, W.W. Vale. Synthetic luteinizing hormone releasing hormone. Short chain analogs. *J. Med. Chem.* 17:230-233, 1974.
- 109.-Humphries, J., Y. Ping Wan, T. Wasiak, K. Folkers. Structural requirements in position 1,2,3,6, of the luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) for antiovaratory activity. *J. Med. Chem.* 22:774-777, 1979.
- 110.-Seprodi, J., D.H. Coy, J.A. Vilchez-Martínez, E. Pedroza, W.Y. Huang, A.V. Schally. Cyclic analogues of luteinizing hormone releasing hormone with significant biological activities. *J. Med. Chem.* 21:993-995, 1978.
- 111.-Dutta, A.S., B.J.A. Furr, M.B. Giles, B. Valcaccia, A.L. Walpole. Potent agonist and antagonist analogues of luteinizing hormone releasing hormone containing an azaglycine residue in position 10. *Biochem. Bio-*

- phys. Res. Comm. 81:382-389, 1978.
- 112.-Coy, D.H., Coy, A.V., Schally, J.A., Vilchez-Martínez, Y., Hirotsu, A., Arimura. Synthesis and biological properties of (D/Ala⁶ desGly¹⁰-NH₂)LHRH ethylamide, a peptide with greatly enhanced LH and FSH releasing activity. Biochem. Biophys. Res. Comm. 57:335-339, 1974.
- 113.-Vilchez-Martínez, J.A., D.H. Coy, A. Arimura, E.J. Coy, Y. Hirotsu A.V. Schally. Synthesis and biological properties of Leu⁶ LHRH and DLeu⁶, desGly¹⁰, NH₂-LHRH ethylamide. Biochem. Biophys. Res. Comm. 59:1226-1231, 1974.
- 114.-Coy, D.H., J.A. Vilchez-Martínez, E.J. Coy, A.V. Schally. Analogs of luteinizing hormone releasing hormone with increased biological activity produced by D-aminoacid substitutions in position 6. J. Med. Chem. 19:423-425, 1976.
- 115.-Ling, N., W.W. Vale. Analogs of luteinizing hormone releasing hormone (factor-LRF) synthesis and biological activity of ((N alfa-Me)Leu⁷)-LRF and (D-Ala⁶.(N alfa-Me)Leu⁷)LRF. Biochem. Biophys. Res. Comm. 63:801-805, 1975.
- 116.-Nestor, J.J., Teresa L. Ho, A. Simpson, B.L. Horner, G.B. Jones, G. I. McRae, B.H. Vickery. Synthesis and biological activity of some very hydrophobic superagonist analogues of luteinizing hormone releasing hormone. J. Med. Chem. 25:795-801, 1982.

CAPITULO 4.

REGULACION, METABOLISMO, MECANISMOS Y SITIOS DE ACCION DE LA GnRH Y SU PAPEL EN LA REGULACION DE LA SECRECION DE GONADOTROFINAS.

Durante las últimas décadas, se ha hecho hincapié en que es el hipotálamo el encargado de regular la secreción de las hormonas hipofisiarias (por medio de hormonas tróficas). Sin duda, las implicaciones de la hipótesis neurohumoral, establecida por Harris, enfocaron el interés de los endocrinólogos sobre el hipotálamo como el integrador más importante de los impulsos aferentes relevantes para la regulación de la glándula pituitaria(1). Fue por esto que en un principio se pensó que los patrones de secreción de las hormonas hipofisiarias eran un reflejo directo y único del nivel de estimulación, efectuado por los factores hipotalámicos y no por una mayor o menor sensibilidad de las células hipofisiarias a dichos factores. Para el caso de las gonadotropinas, fueron Döcke y Dörner los primeros en proponer que la secreción preovulatoria de estas hormonas se debía no sólo a la estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), sino a un aumento en la capacidad de respuesta de los gonadótropos a esta hormona, mediada al parecer por hormonas esteroideas(1,2).

Después de observar que la GnRH(LH-RH) era capaz de estimular la liberación o secreción tanto de LH como de FSH(3, 4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14) muchos investigadores procedieron a comprobar si esta molécula era la única responsable de la secreción de ambas gonadotrofinas y a analizar si no existía un factor hipotalámico diferente a la GnRH que fuese también capaz de estimular la secreción de FSH. Para esto se han llevado a cabo varios estudios de tipo inmunológico, utilizando una gran variedad de sueros anti-GnRH y se observó que cuando se efectúa una inmunización activa o pasiva contra la GnRH se produce una disminución en la liberación de ambas gonadotrofinas(15-23).

4.1 REGULACION.

La integración neuroendócrina del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas que regula los ciclos menstrual y estral tiene como principal objetivo la ovulación. Para que se lleve a cabo este último evento, es necesario que cada una de las partes involucradas cumpla su papel correctamente tanto en tiempo como en magnitud.

4.1.1 REGULACION POR ESTEROIDES DE LA SECRECION DE GONADOTROFINAS.

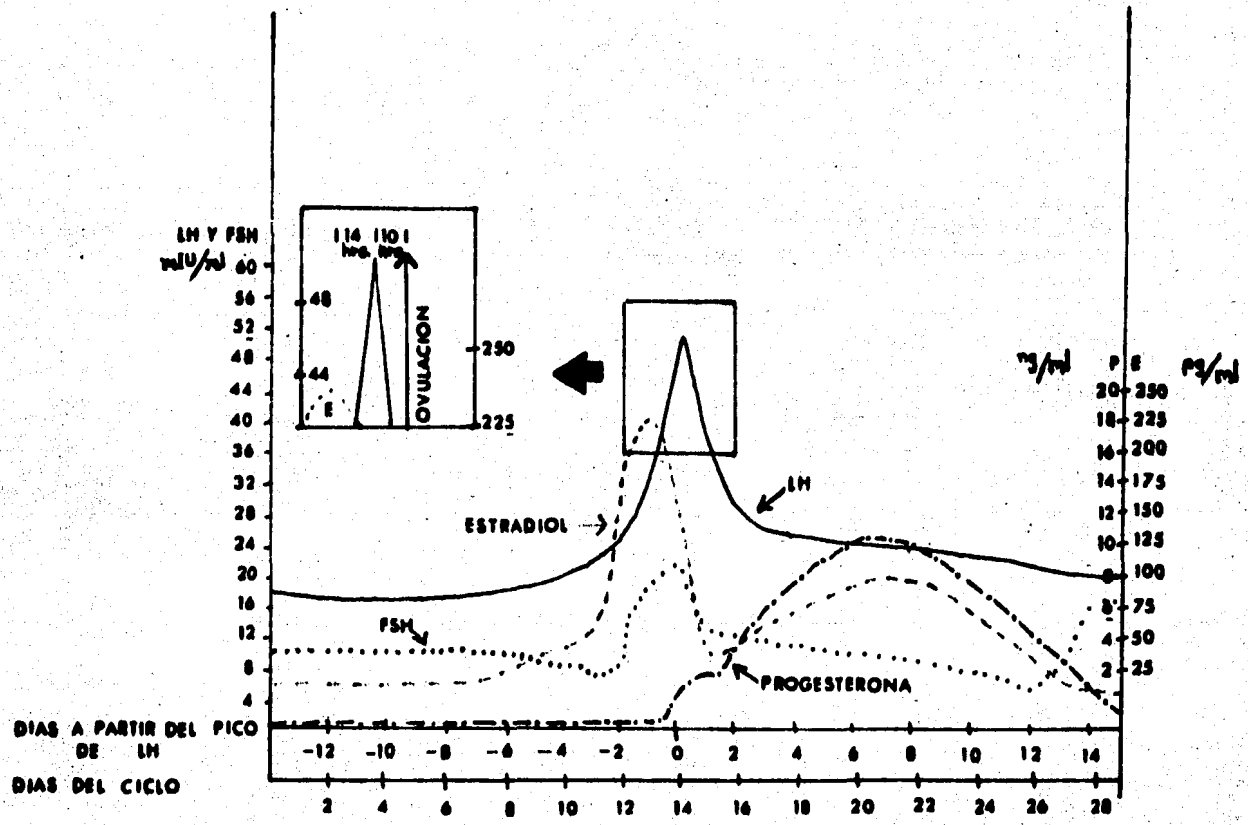


Figura 4.1

El ovario es capaz de sintetizar principalmente 2 tipos de hormonas: los estrógenos y las progestinas. La secreción y síntesis de éstas, está regulada por las hormonas hipofisarias: LH y FSH, llamadas gonadotrofinas. Los efectos de éstas sobre los patrones de secreción ovárica pueden resumirse de la siguiente manera: durante el crecimiento folicular, que ocurre como resultado de una acción combinada de FSH y LH, hay secreción de estrógenos acompañada por una pequeña cantidad de progesterona; con la conversión del folículo en cuerpo lúteo como resultado de los niveles de LH circulantes y la ovulación consecuente, grandes cantidades de progesterona son secretadas por el mismo (24,25)(ver figura 4.1).

Se ha demostrado como resultado de numerosas investigaciones, que los esteroides producidos por las gónadas ejercen un control dual sobre la secreción de las gonadotrofinas(25, 26);estimulándola o bien suprimiéndola(25,27-31). A estos dos efectos se les conoce como retroalimentación positiva y negativa respectivamente.

El efecto de las hormonas esteroides sobre la secreción de las gonadotrofinas se ha observado al medir los niveles de éstas últimas en la pituitaria, en la sangre y en la orina (32,33).

Las mediciones a nivel de la glándula pituitaria se ha-

efían más comunmente en el pasado. Los niveles de las gonadotrofinas en sangre, son una aproximación excelente para la determinación de la velocidad de secreción de éstas, provenientes de la hipófisis. Los niveles urinarios, son también una aproximación razonable de aquellos que circular en sangre, pero debido a que la vida media de las gonadotrofinas es extremadamente corta (menor de 1 hora) (34), las mediciones tanto en orina como en sangre, deben ser debidamente espaciadas, después de una administración de esteroides, para poder medir los cambios en la velocidad de secreción de éstas.

Una de las técnicas fundamentales en la que se ha sugerido el efecto de la retroalimentación negativa de los esteroides sexuales sobre la liberación de las gonadotrofinas, es aquella en la que los ovarios son removidos bilateralmente y se miden entonces la concentración de las gonadotrofinas en plasma e hipófisis. La concentración de PSH y LH aumenta después de una semana (34, 35, 36) y continúan aumentando en el transcurso de un mes aproximadamente, manteniéndose en un nivel alto indefinidamente a partir de este momento. Estos resultados sugieren que, por lo menos, uno de los aspectos de la interacción ovárico-pituitaria, es la retroalimentación negativa o supresión de la liberación de las gonadotrofinas por algún producto de origen ovárico.

4.1.1.1 ESTROGENOS.

Como se indicó, los estrógenos ejercen una retroalimentación negativa sobre la liberación de FSH(25,40). Aún a niveles bajos, la liberación hipofisiaria de FSH es muy sensible a la influencia inhibitoria de los estrógenos(41). A niveles altos, la supresión de FSH es profunda y sostenida. En contraste, la influencia de los estrógenos sobre la liberación de LH varía con la concentración y la duración de la exposición a este esteroide(18,25,28,42,43). Al igual que su acción sobre la FSH, los estrógenos ejercen una retroalimentación negativa sobre la LH(44), pero también son capaces de retroalimentarlo positivamente(12,45) dependiendo de la duración y fuerza del estímulo. La transición entre la supresión y la estimulación de la liberación de LH, parece ocurrir mientras los niveles de estrógenos aumentan paulatinamente en la fase media folicular, pero para que la estimulación sea efectiva, el aumento en la concentración de los estrógenos debe ser brusco, sobrepasando el nivel umbral(en humanos es de 200 pg./ml) además de mantenerse alto por un período de tiempo determinado(en humanos es de 50 horas o más)(25,46,47,48).

Se ha observado, a partir de experimentos hechos en monos, una baja en la liberación de LH por concentraciones

de estrógenos por debajo de dicho umbral a pesar de ser mantenidas por más de 120 h . Así mismo, niveles sobre el umbral pero en el rango fisiológico bajo, retrasan el surgimiento de la LH, mientras que niveles suprafisiológicos lo aceleran. El estímulo estrogénico debe mantenerse entonces arriba del umbral hasta que el surgimiento preovulatorio de la LH se haya llevado a cabo(48,49).

La determinación de los sitios de acción de los estrógenos para ejercer su retroalimentación, han sido el foco de atención de muchos investigadores y las conclusiones son aún controversiales.

Existen evidencias que establecen que esta retroalimentación de los estrógenos, se lleva a cabo tanto en el hipotálamo como en la hipófisis(11,17,41,50,51,52).

Si la secreción de gonadotropinas es restablecida en monos castrados con lesiones hipotalámicas, por una infusión pulsátil de GnRH y los mecanismos de retroalimentación no se ven afectados, indica que la retroalimentación efectuada por los estrógenos ocurre a nivel hipofisario. Conclusiones similares se han obtenido a partir de experimentos con monos a los cuales se les seccionó el tallo hipofisario, en donde, el surgimiento de gonadotropinas inducido por los estrógenos se observó antes y después de la intervención quirúrgica(53).

Además cuando se reemplaza GnRH en forma pulsátil a monos con lesiones en el núcleo arcuato y con ovarios intactos, se pueden inducir ciclos menstruales normales (54, 55, 56). Es por estos hechos, que se ha sugerido que la GnRH juega un papel pasivo pero indispensable en el control de la secreción de las gonadotropinas y que la modulación de los esteroides sexuales por medio de la retroalimentación positiva y negativa hacia la hipófisis, produce el patrón de secreción de gonadotropinas observado en el ciclo menstrual en humanos y el ciclo estral en roedores (57). Parece claro entonces, que los estrógenos pueden modular la secreción de gonadotropinas a través de una acción a nivel de gonadótropos hipofisarios (3, 40). Estudios autoradiográficos han demostrado la existencia de receptores para los estrógenos en la hipófisis anterior. La capacidad de respuesta de la hipófisis a la GnRH, depende de la duración de la exposición a los estrógenos y es proporcional a las concentraciones circulantes de éstos (58). Cuando se expone a la hipófisis a niveles crecientes de estrógenos, de manera similar a los incrementos observados durante la fase folicular tardía, la glándula responde al estímulo de la GnRH con una liberación prolongada y mayor de gonadotropinas (59). En contraste, si la exposición es corta, se deprime la respuesta hipofisaria. Los estrógenos a niveles bajos, no tie-

nen efecto alguno en sensibilizar a la hipófisis a la GnRH, mientras que con el mismo tiempo de exposición pero a dosis más altas, se aumenta la liberación de gonadotrofinas inducida por la GnRH(47,60).

Se ha propuesto que los estrógenos pueden modular la sensibilidad de la pituitaria a la GnRH y la subsecuente liberación de gonadotrofinas, alterando el contenido de receptores en el gonadótrofo(40,61). Sin embargo, la capacidad de respuesta hipofisaria a la GnRH no siempre refleja el contenido de receptores(62,63).

Durante la sensibilización efectuada por los estrógenos, la liberación de LH, inducida por la GnRH, es primeramente suprimida a pesar de que, el contenido de receptores hipofisarios para la GnRH aumenta paulatinamente con el aumento de la exposición a los estrógenos. La capacidad de respuesta de la hipófisis a la estimulación por GnRH parece estar correlacionada de una manera proporcional a la concentración de receptores, solamente cuando se efectúa la retroalimentación positiva. Estas observaciones sugieren que mientras la retroalimentación positiva puede involucrar un aumento en el contenido de receptores hipofisarios para la GnRH, el componente estrógénico que efectúa la retroalimentación negativa, opera a través de un mecanismo distinto(64).

Los estrógenos pueden ejercer su acción inhibitoria tanto en el hipotálamo como en la hipófisis anterior; la microinfusión de estrógenos en el tercer ventrículo o bien en la hipófisis anterior, parece inhibir la liberación de gonadotropinas a través de diferentes mecanismos(51,52,65). Cuando los estrógenos son depositados directamente en la pituitaria, éstos disminuyen la capacidad de respuesta a la estimulación por la GnRH, pero cuando se hace una infusión de estrógenos dentro del sistema nervioso central(en el tercer ventrículo), se observa una disminución en la neurosecreción de la GnRH.

Las conclusiones de que el hipotálamo ejerce una influencia necesaria pero pasiva sobre la secreción de gonadotropinas, se han basado en las observaciones experimentales de: eliminación de las vías aferentes al hipotálamo(corte del tallo hipofisiario) y/o lesiones en el núcleo arcuato y con reemplazo de GnRH(25).

Recientemente, se practicó en monos con ovarios intactos, el aislamiento del hipotálamo, colocando una barrera de teflón en el sitio donde se efectúa la sección del tallo hipofisiario y reemplazando a la GnRH en forma pulsátil. A pesar de que la secreción de gonadotropinas fue restablecida y los niveles prevulatorios de estrógenos fueron secretados, el surgimiento de las gonadotropinas y la subsecuente ovulación, no se lleva

ron a cabo. Al efectuar este experimento, pero con animales a los que se les colocó una barrera empleando silastic en vez de teflón, presentaron ovulación(25). Se ha demostrado que las barreras de silastic son permeables a la GnRH.

Estos resultados sugieren que, para que el surgimiento preovulatorio de gonadotropinas se lleve a cabo, es necesario un mensaje hipotalámico específico, y que quizás sea una liberación aguda(cíclica) de GnRH(66,67).

Tomando como base los resultados de estos experimentos se puede concluir que los estrógenos ejercen su retroalimentación positiva a nivel de dos sitios diferentes: el hipotálamo y la hipófisis. De esta manera se puede decir que la liberación cíclica o preovulatoria de LH es estimulada por los niveles circulantes de estrógenos del folículo maduro, los cuales actúan sobre la hipófisis incrementando el número de receptores a la GnRH(40)y sobre el hipotálamo estimulando la liberación cíclica de GnRH(68). También se puede concluir que el sitio hipotalámico encargado de secretar a la GnRH cíclica se encuentra fuera del área ocupada por el núcleo arcuato(69).

4.1.1.2 PROGESTERONA.

Un aumento significativo en los niveles circulantes de

Progesterona se observa el mismo día en que se obtiene el nivel pico de LH, 12 a 24 horas antes de la ovulación. Este pequeño pero significativo aumento en la progesterona en el período preovulatorio tiene una importancia fisiológica inmensa. (70).

Cuando la progesterona es administrada después de alcanzarse los niveles de estrógenos necesarios para producir el surgimiento de la LH, éste ocurre antes, teniendo una amplitud mucho mayor y una duración más corta que la observada en ausencia de la progesterona (71). En los humanos, hay evidencias convincentes de que sin el aumento preovulatorio de la progesterona, el nivel máximo de FSH observado a la mitad del ciclo y que acompaña al surgimiento de LH, no ocurre en lo absoluto (25,72).

La progesterona afecta la respuesta de retroalimentación positiva de los estrógenos de una manera dependiente de la dosis y del tiempo de exposición. Sólo cuando es administrada después de una sensibilización adecuada por los estrógenos, la progesterona facilitará la respuesta de la retroalimentación positiva. Si se administra antes del estímulo estrogénico o bien en dosis altas coincidentes con los niveles umbrales de estrógenos, la progesterona bloqueará el surgimiento preovulatorio de la LH (25,72,73,74).

La acción retroalimentadora de la progesterona parece ser

ejercida tanto en hipotálamo como en hipófisis(11,51,52,75-77).

Si durante la fase folicular se introducen niveles de progesterona parecidos a los alcanzados en la fase luteal en monos con lesiones en el núcleo arcuato con reemplazo pulsátil de GnRH, no se previene el surgimiento de gonadotrofinas inducida por los estrógenos(78). Esto quiere decir que la inhibición del surgimiento de gonadotrofinas por la progesterona se lleva a cabo a nivel hipotalámico y no hipofisiario. Un tratamiento similar en animales intactos resulta efectivo, pues la inyección de estrógenos para producir una liberación aguda de gonadotrofinas, falla(73,79). Parece claro entonces que la progesterona inhibe la liberación de las gonadotrofinas a nivel del núcleo arcuato y facilita el surgimiento de éstas a la mitad del ciclo a través de una acción sobre la glándula pituitaria(78,80).

4.1.1.3 ANDROGENOS.

Se sabe que los andrógenos administrados sistémicamente inhiben los niveles plasmáticos de LH y FSH en ratas y en humanos. Lo que aún no se conoce con certeza es el posible sitio de acción de estos esteroides. En la actualidad existen evidencias que apoyan la acción de los andrógenos a nivel de la hipófisis(81).

A partir de los estudios realizados con la testosterona,

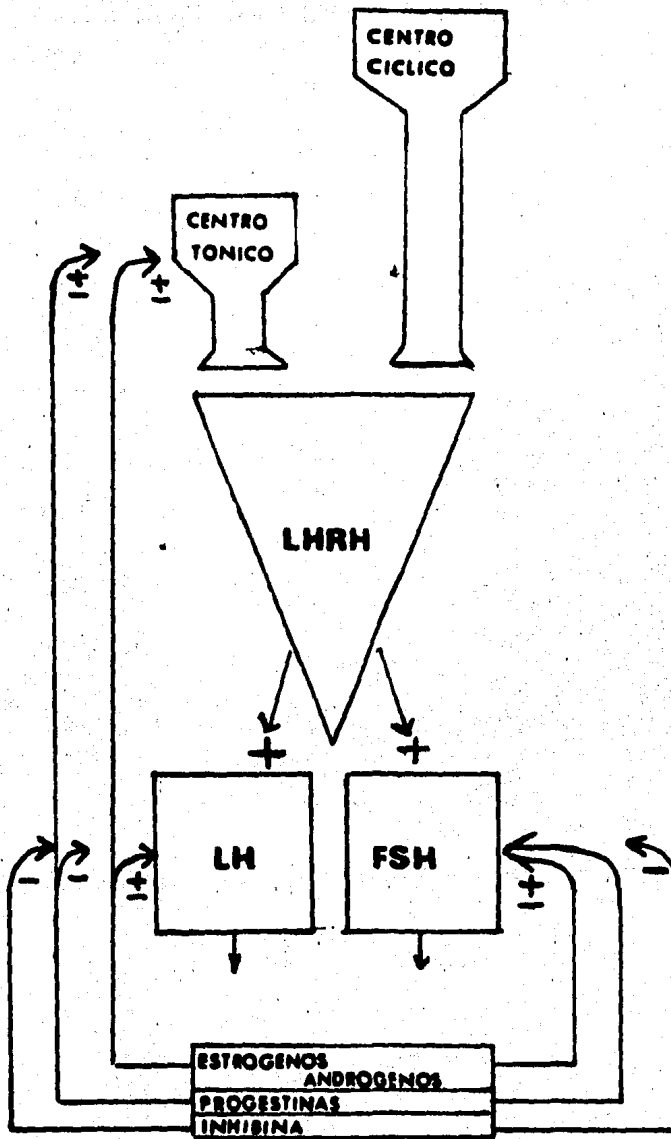


Figura 42 Interacciones entre la GnRH(LHRH), estrógenos, andrógenos, progestinas e inhibina sobre las Gnr.

se ha observado que la capacidad de respuesta de la hipófisis a secretar LH bajo la estimulación de GnRH se ve inhibida. Por el contrario, la secreción de FSH por estimulación con GnRH no sólo no se ve inhibida sino que es estimulada(81).

Estos datos indican que los andrógenos no sólo tienen efectos específicos, sino opuestos a nivel hipofisiario sobre la secreción de LH y FSH. Estos datos han dado posibles explicaciones a las observaciones hechas en ratas(82) y en humanos(83), sobre la mayor sensibilidad a la acción de andrógenos administrados in vivo de la secreción de la LH que la de la FSH(82,83).

Hay evidencias que indican que los andrógenos también ejercen una retroalimentación negativa sobre la secreción de LH a nivel hipotalámico(84,85). Aparentemente existe también un efecto inhibitorio de éstos sobre la secreción de FSH a nivel hipotalámico.

4.1.2 LA GnRH Y SU PAPEL EN LOS PATRONES DE SECRECIÓN DE LAS GONADOTROFINAS.

Se ha demostrado que la liberación de gonadotropinas es rítmica, pulsátil y rápida(45,74,86,87,88,89,90). Este tipo de secreción no es intrínseca a la hipófisis, sino que refleja la estimulación hipotalámica intermitente(74,88,91).

El patrón episódico de la secreción de la GnRH es muy importante para la liberación de gonadotropinas hipofisarias. La liberación episódica de éstas provoca a su vez la liberación pulsátil de los estrógenos(92). Es por esto que la secreción de LH después de la gonadectomía es pulsátil, debido a la naturaleza episódica de la liberación de la GnRH hipotalámica.

La frecuencia y amplitud de la secreción pulsátil de gonadotropinas varía con la fase del ciclo(25). Estas secreciones ocurren cada 60 a 90 minutos a través de casi todo el ciclo, pero disminuyen su frecuencia a 3 o 4 horas durante la fase media y luteal tardía. La amplitud del pulso(la cantidad de gonadotropinas liberadas) es mayor durante la mitad del ciclo y menor durante la fase folicular tardía. El aumento en la producción de estrógenos a partir del folículo preovulatorio puede ser una señal que disminuya la amplitud del pulso observado en la fase folicular tardía. La infusión de estrógenos provoca un efecto similar(93). La modulación por progesterona puede estar implicada en la reducción de la frecuencia del pulso observada durante la fase luteal.

El patrón de secreción de las gonadotropinas, varía de acuerdo al sexo(fenómeno observado originalmente en ratas) pues en las hembras, durante el período de diferenciación sexual,

se incluye la programación de dos centros hipotalámicos: uno de ellos, localizado en el área formada por el núcleo arcuato del hipotálamo medio basal, que genera la liberación tónica(basal) de gonadotrofinas, mientras que el segundo localizado en el área formada por el núcleo preóptico y supraquiasmático, produce el patrón de secreción cíclico(surgimiento pre-ovulatorio) de gonadotrofinas; una integración de estos dos centros resulta en la función reproductora normal; mientras que en machos sólo se presenta la secreción tónica de gonadotrofinas(94,95,96).

Por otro lado, otra de las diferencias básicas entre hembras y machos, se observa después de la gonadectomía, pues mientras los niveles de LH aumentan entre las 8 y las 12 horas después de la orquidectomía en los machos, en las hembras esta gonadotrofina no aumenta en el suero hasta después de 3 días de efectuada la ovariectomía(93,94,97).

Esta información nos sugiere que la diferencia en la sexualidad respecto a la capacidad de respuesta hipofisiaria a la castración, puede ser atribuida a diferencias en la respuesta total de las neuronas monoaminérgicas hipotalámicas. Todavía no se ha resuelto si la diferencia relacionada al sexo después de la castración, está genéticamente predeterminada o bien es resultado de distintos medios esteroidales existen-

tes. antes de efectuarse la gonadectomía (37).

Por otro lado, en monos ovariectomizados, se ha observado un patrón circohoral de secreción pulsátil de LH (87, 98). También se ha observado un patrón circadiano, que depende de la actividad cerebral, cuyas fluctuaciones son muy marcadas durante el día y la noche (99). Esto explica cómo es que en monos con lesiones en el hipotálamo medio basal, la administración pulsátil de GnRH con intervalos de una hora, restaura la secreción circohoral de LH y retorna las gonadotropinas a su nivel original (25, 66, 97, 100, 101). Además, se ha observado que la administración de estrógenos acompañada de la administración pulsátil de GnRH no solamente restaura el nivel de las gonadotropinas, sino que induce el surgimiento preovulatorio de LH en estos animales (25, 37, 100, 102).

En contraste, la administración de GnRH en forma continua, es seguida por un ligero aumento en las gonadotropinas cuya duración es aproximadamente de 5 horas, para después disminuir hasta niveles indetectables a la altura del séptimo día después de la administración de GnRH. Esto indica, que la exposición prolongada a concentraciones elevadas de GnRH, resulta en una disminución de la capacidad de respuesta del órgano blanco (hipófisis) y una consecuente pérdida del número de receptores. Estos datos sugieren que es el patrón de secre-

ción y no la masa total del decapeptido liberado, lo que determina la liberación normal de las gonadotrofinas (66).

El hecho de que la GnRH pueda inducir una desensibilización (downregulation) de sus propios receptores (103), explica el por qué de la disminución abrupta en el contenido de receptores hipofisarios que ocurre coincidentemente con el surgimiento preovulatorio de las gonadotrofinas, pues existen evidencias que indican que hay un aumento preovulatorio de GnRH en la sangre porta (63,104-108). En realidad se ha observado recientemente un aumento de GnRH en la sangre periférica de mujeres normales (86).

Un aumento abrupto en la concentración de GnRH podría entonces ser la causa, de la disminución en la concentración de los receptores hipofisarios, observados en la fase media del ciclo (25). Este mecanismo, implica que el hipotálamo juega un papel mucho más importante y activo del que se tenía pensado.

Una reducción en la secreción de la GnRH provocada por la retroalimentación negativa de los estrógenos, podría promover el aumento en la concentración de los receptores hipofisarios observados durante la sensibilización por esta hormona; más adelante, el efecto de la retroalimentación positiva por los estrógenos, puede involucrar una descarga aguda de

GnRH. Los esteroides sexuales pueden entonces, ejercer su efecto de retroalimentación, sobre la secreción de las gonadotrofinas, modulando la magnitud y la frecuencia de la secreción de la GnRH(25,109).

Como ya fue mencionado anteriormente en este capítulo, la secreción de las gonadotrofinas es dependiente de la magnitud y la frecuencia de los pulsos con que es liberada la GnRH(25, 110), observándose que en monos ovariectomizados y con lesiones en el núcleo arcuato y con reemplazo pulsátil de GnRH empleando concentraciones crecientes mas allá del nivel fisiológico circohoral, la respuesta hipofisiaria se reduce progresivamente y se observa una disminución gradual en los niveles de gonadotrofinas. Si la frecuencia se disminuye, el patrón de gonadotrofinas se altera: la LH disminuye y la FSH aumenta. Una reducción en la amplitud de los pulsos circohorales, disminuye preferentemente la secreción de FSH(25,110).

Otro aspecto intrigante relacionado con el patrón de secreción de gonadotrofinas merece mención. Se ha observado una desproporción en los patrones de secreción de la LH durante el surgimiento de gonadotrofinas, hechos que han sido determinados por radioinmunoensayo y por bioensayo, sugiriendo que la liberación de LH a la mitad del ciclo, puede estar representada por una molécula más activa, biológicamente, que la

secretada en otras fases del ciclo (25,111,112). Otro tipo de observaciones relacionadas a estos hechos, derivan de estudios realizados tanto en mujeres como en ratas, en donde se ha sugerido que la LH es secretada de una manera bifásica. La magnitud relativa de las dos fases de liberación de LH cambia a través del ciclo menstrual o estral y está asociado a la concentración de estradiol circulante. De esta manera este concepto de liberación por fases podría reflejar la existencia de 2 reservas funcionales de LH. Así tenemos la propuesta hecha por Evans, et.al.(113) de que existe una conversión de la reserva potencial(almacenable) a la reserva liberable por medio de un cambio de las características biofísicas de la molécula de LH.

Se ha establecido una relación entre la actividad y la vida media de las hormonas glucoproteicas y su contenido en ácido siálico (114,115). Los efectos reguladores de los esteroides sexuales pueden incluir la modulación de la concentración del ácido siálico, del tamaño y la actividad consecuente de las gonadotrofinas liberadas(112,116).

Recientemente, la bioactividad elevada de la LH ha sido demostrada en un grupo de pacientes con enfermedad poliquística ovárica, con la cual, en parte, se explica el por qué de los niveles altos de andrógenos en tales pacientes(117).

De la misma manera se ha demostrado que la FSH presenta dos formas biológicamente activas. La FSH obtenida de pituitarias de monos ovariectomizados tiene un peso molecular más alto, una velocidad de depuración mas baja y el doble de actividad biológica que la derivada de animales intactos, aunque las dos se encuentran siempre presentes en diferentes concentraciones(116). En ratas, también se ha visto la existencia de dos fases de secreción para la FSH; para este caso específico una de las fases depende de la GnRH y es acompañada de un aumento de LH, y, otra que es independiente de la GnRH, pues no requiere de dicha hormona para que se lleve a cabo su liberación. Para este tipo de observaciones se han postulado algunas explicaciones entre las cuales destaca la que relaciona este fenómeno, a un proceso de autoestimulación hormonal, pues la cantidad de FSH secretada durante la primera fase, parece estimular la secreción de la misma durante la segunda fase. El significado fisiológico de la secreción de FSH durante la segunda fase, no está claro todavía(7,23).

4.1.3 FACTORES NO ESTEROIDES COMO POSIBLES REGULADORES DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROFINAS

4.1.3.1 INHIBINA.

En 1932 McCullagh propuso la existencia de una sustancia de origen testicular, no esteroidal y soluble en agua, que ejercía una retroalimentación específica y negativa sobre la secreción de la FSH. Desde esa época se han reunido evidencias que comprobaban la existencia de esta sustancia, y, en la actualidad se conoce con el nombre de inhibina(24,25,26,118,119, 120). La estructura química de dicha sustancia no se conoce, pero por medio de estudios de purificación se ha llegado a la conclusión de que es de naturaleza peptídica(26). Esta sustancia ha sido aislada en mamíferos hembras y machos, tales como bovinos, porcinos y humanos.

En la hembra, la inhibina es aparentemente sintetizada por las células granulosa(25) y secretada al líquido folicular. En los machos, las células de Sertoli(25,121) son, aparentemente, las responsables de la síntesis de dicho compuesto.

La inhibición de la secreción de la FSH por esta sustancia, es usualmente selectiva, o al menos preferencial, en comparación a la influencia mínima que ejerce sobre la LH.

Originalmente se pensó que la inhibina actuaba solamente a nivel hipofisiario, pero los estudios más recientes han demostrado que esta sustancia actúa a nivel tanto hipofisiario como hipotalámico(118). El mecanismo de acción de esta sus-

tancia a ambos niveles es desconocido.

Hasta ahora no se ha podido establecer qué tipo de influencia tiene esta sustancia sobre la secreción de GnRH. El hecho de que la inhibina sea secretada por las gónadas, indica que debe estar involucrada en la regulación(?) del sistema reproductor.

Se desconoce hasta ahora qué grado de importancia fisiológica tiene la acción de la inhibina.

4.1.3.2 PROSTAGLANDINAS.

Puede suponerse que las prostaglandinas están involucradas en la función hipotalámica-hipofisiaria, ya que estas sustancias están ampliamente distribuidas en el sistema nervioso central, incluyendo al hipotálamo, y, además son liberadas por el sistema nervioso central durante la actividad nerviosa(1). Sin embargo, hasta hace muy poco, se empezó a investigar la relación entre las prostaglandinas y la función hipotalámica-hipofisiaria(1,122).

Se ha observado que las prostaglandinas parecen tener un efecto estimulante a todos los niveles del eje hipotálamo-hipofisis gónadas. La acción de estas sustancias, puede ser localizada en el cerebro, por su inyección en el tercer ventrículo(24). La inyección de prostaglandina E₂ en ese sitio

causa un aumento en los niveles de LH y FSH en sangre de ratas ovariectomizadas, mientras que la inyección de esta prostaglandina directamente en la glándula pituitaria es inefectiva(122,123,124).

No se sabe aún con certeza cómo afectan las prostaglandinas la liberación de gonadotrofinas. Si se utiliza un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, como la indometacina (24,122,123,125), se observará un bloqueo en la ovulación, el cual puede ser regenerado por la inyección de LH, cuando el fármaco se administra poco tiempo después del surgimiento de LH para efectuar la ovulación pero este efecto no se observa si la droga se administra crónicamente. Estas observaciones sugieren que la función de las prostaglandinas en el control de la ovulación, se realiza modulando la liberación de gonadotrofinas como la maduración folicular(1).

Es probable que las prostaglandinas ejerzan su efecto a través de la vía del AMP cíclico, pues se ha observado que aumentan la actividad de la adenilciclase y del AMP cíclico en la hipófisis. Ambos compuestos tienen un papel importante en el control de la liberación de las gonadotrofinas(122).

Como se ha visto que la inyección de prostaglandina E₂ directamente en la hipófisis no produce liberación de LH(122, 123,125), se ha concluido que el sitio de acción principal

de la prostaglandina E2 es a nivel del sistema nervioso central(122,123).

Ojeda y colaboradores(126), concluyeron que la prostaglandina E2 tiene la propiedad de liberar LH por su acción sobre las neuronas secretoras de GnRH, pues los agentes que bloquean las sinapsis adrenérgicas, colinérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas fallan en bloquear la liberación de LH causada por la prostaglandina E2. Se ha visto que la prostaglandina E2 parece ser la más potente de éstas, la prostaglandina E1 tiene menor efecto, y, que las prostaglandinas F1 y F2 son totalmente inefectivas(24).

Los efectos de las prostaglandinas son dependientes del tipo, la dosis y la ruta de administración y del estado endocrino del individuo al tiempo del experimento.

4.1.4. FACTORES AMBIENTALES QUE MODULAN LA SECRECIÓN DE LAS GONADOTROFINAS

4.1.4.1 LUZ

Uno de los estímulos externos más importantes que afectan al fenómeno reproductivo en casi todos los vertebrados incluyendo al hombre es la luz(127).

En la rata, por ejemplo, los fenómenos de ovulación y calor están íntimamente relacionados con el ritmo luminoso al

que están expuestos. Si la luz es cambiada, es decir, luz de noche y oscuridad de día, las fases del ciclo estral también cambian. Si estos animales son expuestos a la luz continua, el ciclo ovárico cesa totalmente y las ratas presentan un estro vaginal constante, con folículos ováricos que se transforman en quistes persistentes.

No todos los animales parecen ser tan sensibles a la duración del ciclo luz/oscuridad, como en la rata o el borrego. La actividad en el hombre parece mantenerse normal bajo una variedad de condiciones luminosas, así los ciclos menstruales y la eficiencia reproductiva, son mantenidas por igual, tanto por esquimales como por gente que vive en las zonas tropicales. Similarmente, la pérdida de la visión, aún la debida a defectos congénitos a ausencia de órganos visuales no conduce a un mal funcionamiento reproductivo. Se supone, de manera general, que la luz actúa sobre el sistema hipotalámico-hipofisiario, y que afecta al complejo gonadotrófico cuali y cuantitativamente.

Los resultados de investigaciones recientes indican que la acetilcolina puede ser la encargada de traducir el efecto "luz" en ratas.

Aún no se sabe con certeza, cómo es que la luz produce su efecto sobre el sistema hipotalámico-hipofisiario. Se pre-

sume que la luz actúa de la misma manera que una lesión en la región supraquiasmática en el hipotálamo de la rata, previniendo el surgimiento de LH requerido para la ovulación (128,129, 131).

La evidencia de una conexión o vía retinotalámica nerviosa, es equivocada, pues no se ha encontrado tal conexión anatómica. Ganong, et.al.(130), encontraron que pequeñas cantidades de luz, pueden pasar a la cavidad craneana a través de los huesos delgados que descansan sobre la parte anterior de los lóbulos temporales, implantando celdas fotovoltaicas (sensibles a la luz) en el hipotálamo de una variedad de mamíferos. A pesar de su efecto de bloquear la ovulación, la luz es incapaz de bloquear el aumento de secreción de LH que prosigue a la ovariectomía (128).

4.1.4.2 OLOR.

Se conoce muy poco sobre este estímulo externo, pero se cree que interviene en la sincronización de los ciclos reproductivos de varios mamíferos.

Por ejemplo, si los bulbos olfatorios son removidos, en la hembra del cerdo, el ciclo cesa y no hay ovulación en la mayoría de los animales tratados (127). Los ovarios de estos animales contienen folículos de un tamaño parecido a los pre-

sentados al tiempo de la ovulación, pero aparentemente no sintetizan suficientes estrógenos para causar "el calor"(estro). En estas hembras anósmicas, parece que la hipófisis secreta FSH, pero no LH, como lo evidencian la falta de ovulación y la ausencia de secreción de estrógenos.

En el hombre se presenta una atrofia genital, en individuos afectados por defectos congénitos respecto al desarrollo de los bulbos olfatorios(127). Este trastorno es normalmente conocido como "Síndrome de Kallman"(132) y se ha encontrado que la deficiencia principal en estos individuos reside en una insuficiencia en la secreción de GnRH(ver capítulo 5).

4.1.4.3. LACTANCIA.

A diferencia del estímulo luminoso, el efecto de la lactancia en ratas ovariectomizadas, es el de disminuir la síntesis y la liberación de la LH(128). Como el efecto se manifiesta aún en ausencia de los ovarios, es de pensarse que este fenómeno sea independiente de aquellos mediados por esteroides ováricos, y probablemente sea causado por el estímulo mismo de amamantar(efecto de succión) y por los niveles altos de prolactina circulantes durante esta época.

4.1.5 NEUROCONTROL DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROFINAS.

La GnRH es secretada por neuronas hipotalámicas neurosecretoras cuyo cuerpo celular aparentemente se encuentra en el núcleo arcuato y con los axones proyectándose hacia la eminencia media (25). La liberación de esta neurohormona ocurre como respuesta a diversos impulsos nerviosos (aférentes) operados a través de neurotransmisores. Las catecolaminas: dopamina y norepinefrina, parecen ser los neurotransmisores principales que se involucran en la secreción de la GnRH, a pesar de haber otros péptidos pequeños que también se encuentran involucrados (133-137, 213, 214). La serotonina (138-141) y la melatonina (25), inhiben la liberación de gonadotropinas, mientras que la acetilcolina (142) y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) (25), presentan el efecto contrario (143, 144, 145).

4.1.5.1 CATECOLAMINAS.

Se ha propuesto que, los factores de liberación y las monoaminas pudieran coexistir en la misma neurona, basándose en la observación de dos tipos de estructuras diferentes contenidas en los axones localizados en la eminencia media: gránulos alargados y vesículas más pequeñas. Los gránulos alargados se relacionaron con la GnRH y las vesículas más pequeñas con el

almacenamiento de neurotransmisores. Pero estudios más recientes han demostrado que las neuronas que contienen GnRH, son una población de células distintas a las que contienen neurotransmisores(146,147).

Las bases experimentales para llegar a resultados concretos sobre el papel de las monoaminas en la liberación de las gonadotropinas se han obtenido de algunos estudios farmacológicos como son: 1) el empleo de precursores o inhibidores de la síntesis de monoaminas(148-152);2) la infusión de dopamina y norepinefrina al tercer ventrículo(62,153);3) la medición de la concentración homeostática de catecolaminas en la eminencia media(154,155);4) la determinación del recambio de norepinefrina por medio de inyecciones de norepinefrina tritiada a fragmentos hipotalámicos(155,156);5) la medición de la actividad de la tirosina hidroxilasa en núcleos hipotalámicos(157).

Una medición apropiada y con significado fisiológico para examinar la participación de los sistemas monoaminérgicos en las respuestas hipofisarias a la castración, es la estimación de la velocidad del recambio(turnover) de las catecolaminas en conjunto con las mediciones de GnRH en el mismo tejido hipotalámico(158), pues se ha reconocido que la medición del contenido cerebral de las catecolaminas, no provee de un índi

ce real funcional de la actividad catecolaminérgica, ya que las concentraciones de éstas, son relativamente estables con el tiempo y no propocionan información acerca de la velocidad de síntesis y degradación o liberación de éstas(159,160).

En investigaciones de tipo farmacológico, en las que se han usado diferentes drogas antiadrenérgicas inhibidoras de la síntesis de epinefrina y norepinefrina(161) bloqueadores de los receptores alfa y depresores del almacenamiento catecolaminérgico(162), se ha observado un bloqueo del aumento de LH en el proestro de la rata. Adicionalmente, drogas neurotóxicas como la 6-hidroxipamina, cuando son inyectadas en la prominencia ventral tegumentaria y en el área preóptica, interrumpen temporalmente al sistema catecolaminérgico y por lo tanto los ciclos ovulatorios en las ratas(159,163).

También se ha observado, que al hacer inyecciones en el tercer ventrículo de concentraciones farmacológicas de norepinefrina, se detecta liberación de LH, por lo que se ha llegado a establecer razonablemente que la norepinefrina aparece como un agente estimulador de la liberación de gonadotrofinas (25,138,164-167). Hay diferentes reportes que indican que el recambio de norepinefrina en el hipotálamo, hipófisis anterior e incluso todo el cerebro, aumenta después de la ovariectomía y disminuye o se inhibe con el tratamiento de estrógenos o tes

tosterona(25,137,138,164,166,168,169). Ojeda y McCann(166) utilizaron drogas que selectivamente modifican los niveles cerebrales de catecolaminas y sugirieron que la elevación en las gonadotrofinas plasmáticas que sucede después de la ovariectomía, es causada por un aumento en la transmisión a través de las sinapsis noradrenérgicas. Estos mismos autores, al hacer una correlación de los niveles de LH y norepinefrina después de ovariectomía, observaron que los cambios en el contenido de norepinefrina tienen lugar antes del aumento de LH (158), y que éstos podían ser inhibidos por la misma dosis de testosterona que bloquea el aumento de LH inducido por la castración. Estos hechos indican que la noradrenalina tiene un papel regulador importante en la secreción de las gonadotrofinas(166,158).

Se ha visto que agentes bloqueadores de los receptores α -adrenérgicos, administrados a monos ovariectomizados, inhiben la secreción pulsátil de gonadotrofinas(25,138,148). En contraste los bloqueadores β -adrenérgicos, no tienen ningún efecto(170,171). Sin embargo, la acción inhibidora por el bloqueo α -adrenérgico no se observa en animales con lesiones en el núcleo arcuato y con reemplazo exógeno y pulsátil de GnRH(172). Más aún, la depresión selectiva de noradrenalina hipotalámica, elimina la secreción pulsátil de LH en ratas

ovariectomizadas(173). Estos estudios sugieren, como antes fue mencionado, que la noradrenalina actúa como un neurotransmisor promotor en la modulación de la liberación de GnRH(148, 154,171,174,190). Así mismo, la norepinefrina está involucrada en la transducción de los efectos retroalimentadores de los esteroides gonadales, por ejemplo, los efectos estimulantes de la progesterona son bloqueados por la fenoxibenzamina y el haloperidol(bloqueadores α -adrenérgicos). A partir de esta clase de experimentos se ha propuesto a la norepinefrina como el posible mediador del efecto estimulante de la progesterona sobre la liberación de gonadotropinas a nivel de la región preóptica(138,159,175,176).

La dopamina(177-181), precursor inmediato de la norepinefrina en la síntesis de catecolaminas, inhibe la liberación tanto de gonadotropinas como de prolactina(25,136,148,182, 183). En referencias anteriores(133,136,148,182,184,185), se reportó una acción dual para la dopamina a bajas concentraciones se observó liberación de GnRH, y a altas concentraciones se observó una estimulación de la degradación de la GnRH. Además de suprimir al lactótrofo hipofisiario , a través de la neurosecreción directa a la circulación porta, la dopamina parece inhibir la liberación de gonadotropinas a través de una acción central sobre la neurona productora de GnRH y no

a través de una acción directa sobre la hipófisis, ya que implantes directos de dopamina en la hipófisis anterior no producen alteraciones de la concentración de LH en suero(159,186, 187). Se dice que las neuronas dopaminérgicas ejercen su acción a través de una secreción transportada "axo-axonalmente" en el área de la eminencia media y no a través de efectuar sinapsis con el cuerpo celular neuronal(25).

De esta manera se puede concluir que, la secreción de GnRH refleja un balance entre la excitación noradrenérgica y la inhibición dopaminérgica.

La supresión de la liberación de gonadotropinas por la dopamina, es más enérgica en la etapa preovulatoria. Esta hipersensibilidad selectiva al tiempo que los niveles de LH son los más altos y que la actividad de la GnRH presumiblemente se encuentra elevada, sugiere que la dopamina actúa inhibiendo la liberación de la GnRH(178). También se ha observado, que las neuronas dopaminérgicas son estimuladas por los estrógenos, debido a que éstas contienen receptores para esos esteroides, representando esta situación, un mecanismo que indique cómo los estrógenos podrían llevar a cabo la retroalimentación negativa sobre la liberación de LH. En estudios llevados a cabo con ratas ovariectomizadas, se ha demostrado, que los estrógenos pueden modificar la inhibición de la dopamina

sobre la secreción de las gonadotropinas, pues se ha visto, que la activación de los receptores dopaminérgicos por estimulación eléctrica(186) puede inhibir la secreción pulsátil de LH en ratas ovariectomizadas, no tratadas con estrógenos (188,189), no observándose dicha inhibición en ratas ovariectomizadas pretratadas con estrógenos. Estas observaciones podrían explicar de alguna manera los posibles mecanismos de la retroalimentación positiva de los estrógenos en la secreción , a nivel hipotalámico. Puede observarse entonces, que la estimulación de los receptores dopaminérgicos afectarán la liberación de la GnRH de diferentes maneras las que dependerán de: 1) la dosis de dopamina utilizada, 2) la ruta de administración, y 3) el medio ambiente esteroidal (133). También se ha demostrado que el grado de supresión de la secreción de LH por la dopamina , está relacionado a la concentración basal de LH y que, como ya se mencionó anteriormente, esta supresión es máxima en el tiempo del surgimiento preovulatorio de LH(133).

4.1.5.2 CATECOLESTROGENOS.

En investigaciones hechas sobre el metabolismo del estradiol en el cerebro, se ha revelado que el hipotálamo es rico en actividad enzimática encargada de hidroxilar a este compuesto en posición 2 (estradiol 2-hidroxilasa)(25,191,192,193,

194,195). La adición de un grupo hidroxilo(OH⁻) en la posición 2, dá a los estrógenos, una similitud estructural a las catecolaminas(dopamina y norepinefrina) (ver figura 4.4)(192,196), por lo que se les ha denominado " catecolestrógenos ". Como resultado de esta similitud, la enzima catecol-orto-metil-transferasa(COMET), responsable de la degradación de las catecolaminas, también metaboliza a los catecolestrógenos(197,198). Sin embargo, esta enzima exhibe una afinidad mucho mayor por los catecolestrógenos que por las catecolaminas mismas. Como sustrato preferido, los catecolestrógenos pueden competir efectivamente por la catecol-metil-transferasa y tener así la capacidad de alterar las concentraciones efectivas de catecolaminas.

Al producir una elevación transitoria del contenido de las catecolaminas hipotalámicas, los catecolestrógenos pueden influenciar la actividad neuronal peptidérgica de la GnRH y modular así la secreción de gonadotrofinas. Por otro lado, los catecolestrógenos también inhiben la tirosinhidroxilasa, enzima responsable de la síntesis de catecolaminas(dopamina) a partir de la tirosina. De esta manera, los catecolestrógenos pueden reducir efectivamente los niveles hipotalámicos de catecolaminas(193).

Alternativamente, éstos pueden ejercer su acción retroali

mentadora directamente a través de los mecanismos que emplean a los receptores estrógenicos o bien, interactuar con los sitios receptores para las catecolaminas(188,199,200).

Las características estructurales inherentes a los catecolestrógenos, los hace únicos y además candidatos atractivos para representar los posibles intermediarios en la modulación ejercida por los estrógenos a la liberación de las gonadotropinas.

No se sabe con certeza, si los catecolestrógenos actúan a través de receptores estrogénicos presentes en el eje hipotálamo-hipófisis para inhibir o estimular la liberación de LH. Hay evidencias que nos indican que los efectos inhibidores agudos de los catecolestrógenos sobre la secreción de LH, no están mediados ya sea por la inhibición de la actividad de la tirosihidroxilasa, la competencia por la catecol-orto-metiltransferasa, el enlace a receptores noradrenérgicos postsinápticos, o bien a alteraciones en la actividad hipotalámica de dopamina y norepinefrina.

Es posible que los catecolestrógenos puedan activar receptores noradrenérgicos presinápticos o alterar directamente la estimulación de las neuronas productoras de GnRH, a través de cambios en la permeabilidad iónica de las membranas neuronales. Otra posibilidad sería que los catecolestrógenos ejercie

ran su efecto a través de receptores dopaminérgicos en la em
nencia media (201) y en la hipófisis anterior(202).

Aunque la administración de catecolestrógenos (por ejem-
plo 2-OH/estróna), produce efectos de retroalimentación tanto
positivos como negativos, es necesario hacer nuevas investiga-
ciones para esclarecer perfectamente el papel de éstos en la
secreción de la GnRH (203-206).

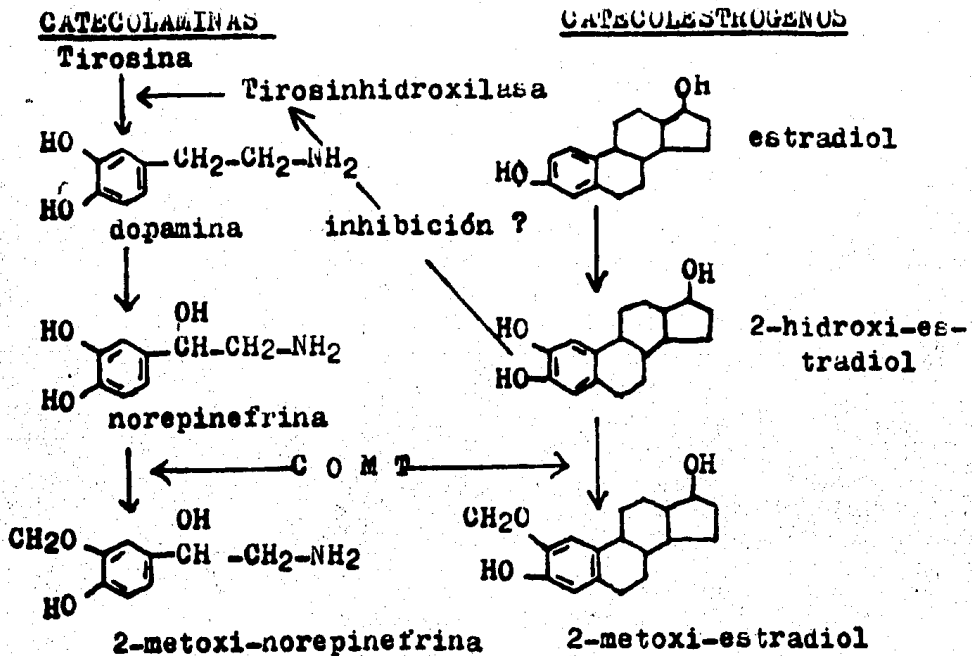


Figura 4.4

4.1.5.3 ENDORFINAS.

Existen evidencias que proponen que los péptidos opiáceos
endógenos: las encefalinas y las endorfinas, tienen una fun-
ción en la regulación de la secreción hormonal del sistema hi-
potalámico hipófisario(207,208). Estos péptidos, son producto

de la degradación de la β -lipotropina y presentan una actividad similar a la de la morfina (ver figura 4.5) (25, 209-212).

PRO-OPIOMELANOCORTINA

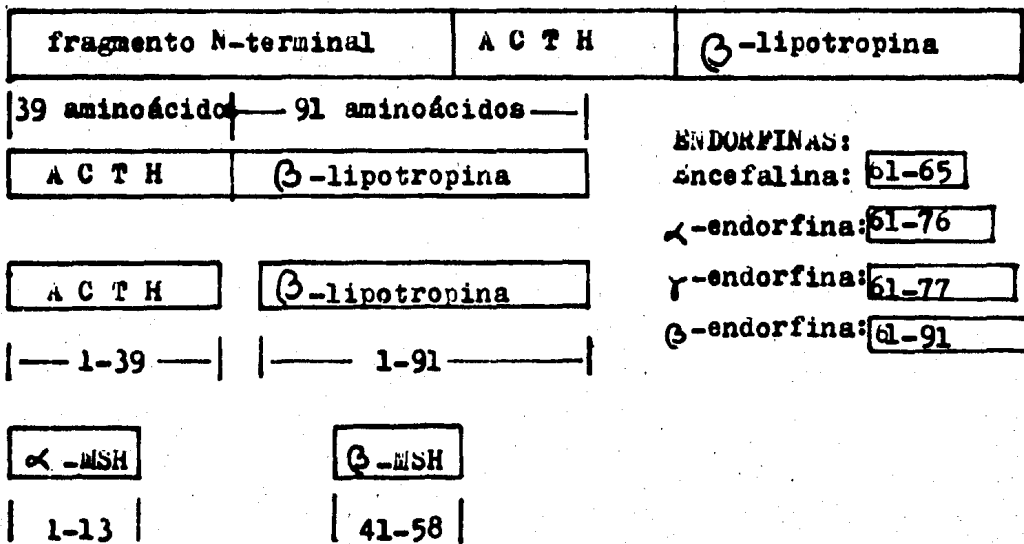


Figura 4.5

Las observaciones de que, tanto la morfina y la β -endorfina estimulan la liberación de PRL en las pituitarias de monos a los que se les ha seccionado el tallo infundibular, sugieren un sitio de acción a nivel hipotalámico (215-216).

La localización de receptores opiáceos en las neuronas dopaminérgicas (217) y, la demostración de que las endorfinas inhiben la liberación de dopamina al sistema portal sanguíneo, sugiere que los opiáceos podrían elevar los niveles de PRL, disminuyendo la inhibición tónica de la liberación de la misma (218). Estos péptidos, las endorfinas, parecen también estar involucradas en la modulación de la secreción de las gonadotropinas (219). Por ejemplo, la respuesta de estas últimas a

la administración de un antagonista opiáceo, varía con la fase del ciclo(220).

El antagonista más utilizado es la naloxona (25,197) que al ser administrada durante la fase luteal, pero no en la fase folicular temprana, aumenta los niveles de LH, como resulta de aparente de un aumento en la frecuencia y la magnitud de la secreción pulsátil de la LH (221). La inyección directa de β -endorfina durante la fase folicular temprana, eleva rápidamente los niveles de PRL y disminuye los niveles de LH (207).

Como resultado de estas observaciones se ha pensado que probablemente las endorfinas tienen que ver con el patrón de secreción de las gonadotropinas durante la fase luteal, pues aparentemente estos derivados opiáceos disminuyen la frecuencia y aumentan la duración de los pulsos de LH y FSH durante esta etapa(222).

Como apoyo a esta hipótesis, también se ha encontrado que la liberación hipotalámica de las β -endorfinas puede ser estimulada por los esteroides ováricos. Es por esto que en animales ovariectomizados no se observa liberación de endorfinas (223). Si se toma en cuenta que durante la fase luteal los estrógenos y la progesterona se encuentran elevados(figura 4-1), se podría pensar que éstos ejercen una retroalimentación negativa a nivel hipotalámico sobre la liberación de la GnRH y con

secuente de las gonadotropinas usando como intermediario de este efecto a las endorfinas. Esto además podría explicar porqué el patrón de secreción de gonadotropinas observado durante la fase folicular es contrario al de la fase luteal, pues durante la primera etapa, el ambiente esteroidal se encuentra disminuido y por lo tanto no existe el estímulo necesario para inducir la liberación de la β -endorfina (223). Este último punto se ha demostrado tanto en animales como en humanos(224).

En conjunto, estos estudios indican que los péptidos endógenos opiáceos pueden inhibir la actividad neuronal de la GnRH ya sea directa, o indirectamente a través de la supresión de neuronas noradrenérgicas(figura 4.3)(225,226). Se ha observado que las endorfinas pueden afectar la secreción de gonadotropinas a través de su acción sobre neuronas dopaminérgicas. La disminución eventual de LH, observada después de una inyección de β -endorfina es precedida por un aumento pasajero de ésta, proseguida por una disminución marcada de la LH (207).

Una reducción en la actividad dopaminérgica (inducida por la β -endorfina), podría marcar inicialmente el retiro de la inhibición de la secreción de GnRH, mientras se estimula la secreción de PRL, promoviéndose a su vez, una estimulación a la secreción de dopamina que a su vez suprimirá la liberación de la GnRH. Tal mecanismo, podría ser la explicación de la reg

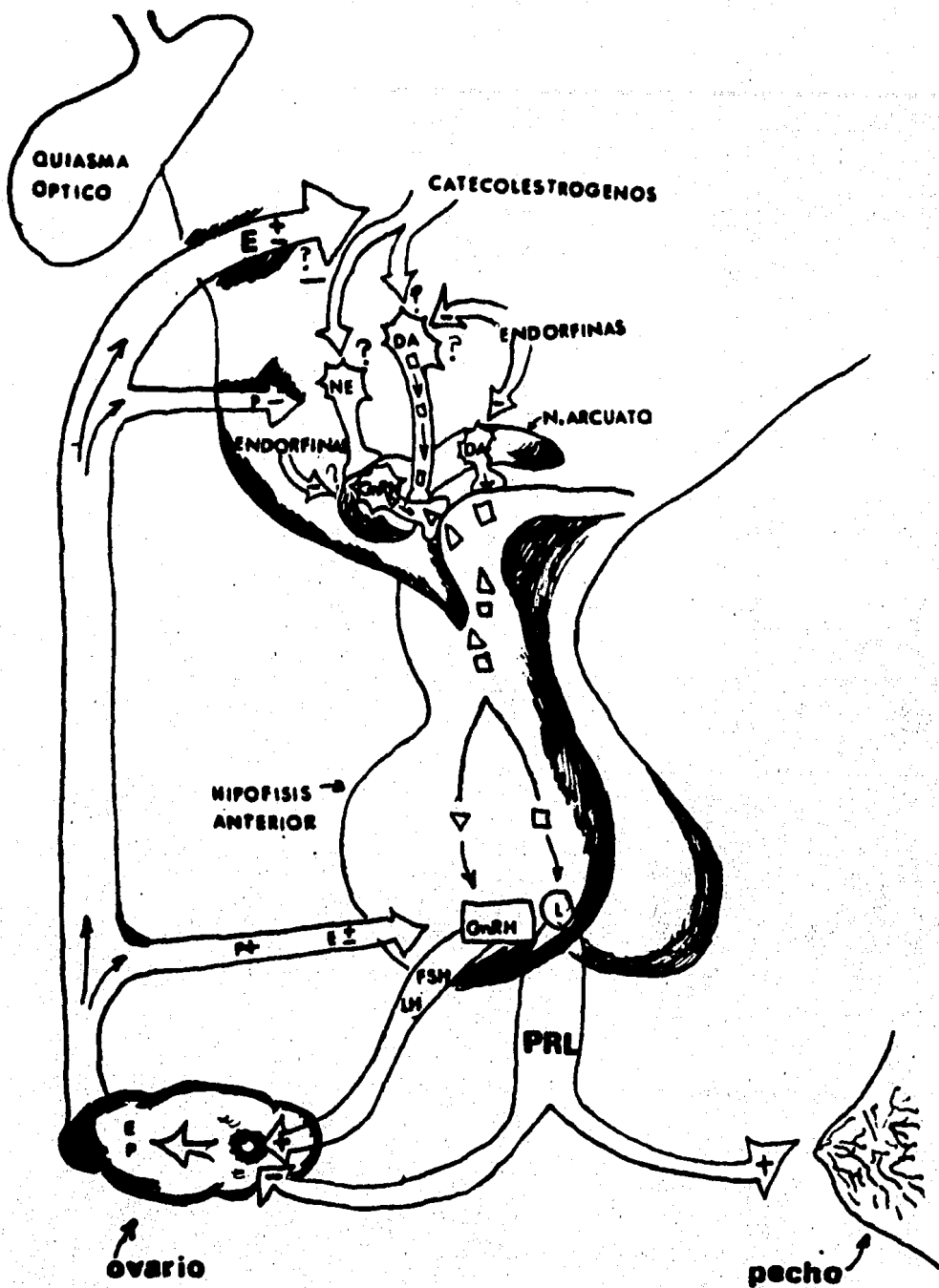


Figura 4.3
 Control neuroendocrino de la secreción de gonadotropinas.

puesta bifásica de la LH, mencionada con anterioridad dentro de este capítulo (ver sección 4.1.2)(25).

Un aumento en la actividad de opiáceos endógenos, se ha observado en la amenorrea y se ha propuesto como una de las causas de la supresión de las gonadotrofinas y valores elevados de PRL, asociados con el ejercicio y el stress (227-228).

5.1.5.4 ENDOPEPTIDASAS.

Recientemente, se ha puesto mucha atención, en la posible participación de las peptidasas hipotalámicas en la regulación de los neuropeptidos que intervienen en los eventos neuroendócrinos(229-233).

La presencia de peptidasas activas que degradan a la GnRH han sido reportadas en el tejido hipotalámico(234-239,254) y en hipófisis anterior de rata (241).

La actividad de las peptidasas presentes en tejido hipotalámico se ha demostrado ser un componente tanto de células nerviosas como de células no nerviosas (229).

Debido a que la cantidad disponible de GnRH para ser liberada en la eminencia media depende de la velocidad de síntesis y degradación de dicha molécula, existe por lo tanto, la posibilidad de que estos sistemas enzimáticos puedan tener un papel funcional o fisiológico relevante en la regulación de la

liberación de GnRH, dentro de la circulación porta (229-231).

El evento principal en el cuál la inactivación enzimática de la GnRH puede jugar un papel fisiológico, es en la génesis del aumento ovulatorio de la LH, que ocurre en la etapa preovulatoria. Una disminución en la degradación total de la GnRH en la eminencia media se ha observado durante esta etapa. Esto, aparentemente da como resultado, la acumulación transitoria de la GnRH, observada en las terminales de las neuronas peptidérgicas (productoras de GnRH) (229,244).

Se ha propuesto la existencia de varias clases de peptidasas capaces de degradar a la GnRH, entre las cuales se pueden mencionar a la enzima que rompe el enlace postprolina (exopeptidasa) que fue una de las primeras en descubrirse. Posteriormente, se describieron otras enzimas que degradan a la GnRH a nivel de enlaces peptídicos internos (endopeptidasas), entre las cuales destacan las enzimas que rompen los enlaces peptídicos formados por los residuos de Tyr⁵-Gly⁶ y Gly⁶-Leu⁷ (240, 242,246).

Los resultados de múltiples investigaciones, indican que la disminución de la degradación de GnRH, parece estar relacionada específicamente a la inhibición de la metaloendopeptidasa responsable de la hidrólisis del enlace Tyr⁵-Gly⁶ (229, 243). No se han encontrado cambios en la actividad de todas las

demás enzimas hipotalámicas que puedan degradar a la molécula de GnRH (247,248).

Investigaciones recientes, han demostrado que enzimas del tipo de las arilamidasa, no se encuentran involucradas, aparentemente, de una manera fisiológica importante en la degradación de la GnRH en tejidos hipotalámicos, pues en las determinaciones de la actividad enzimática llevadas a cabo en intervalos de 4 horas durante todo el ciclo, se observaron resultados muy similares, indicando, que la concentración efectiva de esta enzima no varió considerablemente. Además de que los ensayos efectuados carecían de especificidad con respecto a la preparación enzimática y no se mencionó el análisis secuencial de aminoácidos que determina el sitio en que la molécula de GnRH fue rota (247-251).

Utilizando bloqueadores noradrenérgicos, que inhiben la síntesis de norepinefrina, del tipo del dietilditiocarbamato (DDC), se ha encontrado que no se lleva a cabo la disminución de la actividad de la metaloendopeptidasa normalmente observada en este período, con lo cual el incremento tanto de la GnRH como de LH, no se llevan a cabo. (252,253).

También se ha encontrado, que la actividad de la metaloendopeptidasa es función del nivel de dopamina presente en las neuronas peptidérgicas (184). En estudios in vitro, usando pre

paraciones sinaptosomales, se ha observado que la dopamina incrementa la degradación de la GnRH (184,229), por lo que existe la posibilidad de que el bajo recambio de dopamina observado durante el período preovulatorio, pueda estar relacionado a la baja actividad de la metaloendopeptidasa.

La retroalimentación positiva de los esteroides ováricos, llevada a cabo en la fase preovulatoria del ciclo, se ve expresada en primera instancia, por un aumento en el recambio de norepinefrina y por una disminución concomitante en el recambio de dopamina; estos efectos a su vez, producen una disminución de la degradación de la GnRH, promoviéndose así, un aumento transitorio en los niveles de esta hormona en eminencia media, antes de que se lleve a cabo la secreción activa de la misma, que es el prelude del incremento hipofisiario de las gonadotrofinas (244).

Por otro lado, la retroalimentación negativa efectuada por los esteroides ováricos durante la fase luteal, podría involucrar mecanismos neuronales análogos a los de la retroalimentación positiva, pero en los que intervienen otro tipo de intermediarios como lo son las endorfinas, cuya síntesis es estimulada durante esta fase del ciclo por los esteroides ováricos, y, que provoca a su vez un aumento en la síntesis de dopamina y una disminución en la norepinefrina. Esto último trae

como consecuencia un aumento en la actividad de la metaloendopeptidasa encargada de la degradación de la GnRH en la eminencia media.

4.1.6 BIOSÍNTESIS DE LA GnRH.

Después de años de esfuerzo, se sabe relativamente poco acerca de la biosíntesis de la GnRH.

Antes del descubrimiento del decapeptido de la GnRH, se realizaron estudios preliminares en los cuales, extractos hipotalámicos fueron incubados en la presencia de una mezcla de 21 aminoácidos (incluyendo a los aminoácidos esenciales), ATP, y Mg^{2+} , dando lugar a un péptido con actividad de GnRH que fue determinada por bioensayo (231, 255). Posteriormente, se hicieron ensayos con aminoácidos marcados, encontrándose que la incorporación de aminoácidos se encuentra aumentada en ratas castradas.

Se ha propuesto la existencia de un precursor para la GnRH cuya longitud precisa no es todavía conocida (256).

En experimentos llevados a cabo con RNA mensajero (mRNA) extraído de hipotálamo de rata, se ha podido llegar a la traducción de este precursor, a través de un sistema dependiente de ribosomas en cultivo, en donde se obtuvo un polipeptido de 28 000 daltons, que incorporó la secuencia del decapeptido big

lógicamente activo de GnRH y que probablemente representa el precursor de la GnRH, que bien puede contener otros peptidos activos distintos a la GnRH o bien sólo contener más de una secuencia de la GnRH (256).

Con respecto a la liberación de la GnRH, se ha visto que además del ATP y el Mg^{2+} , el cobre (Cu^+) provoca indirectamente la liberación de la GnRH, iniciando una cascada de eventos que culminan con la ovulación, sin que se requiera la presencia de iones K^+ en el medio. No se sabe aún con certeza, cuál es el mecanismo por el cual se lleva a cabo este efecto, pero se sugiere que el mecanismo a través del cual el Cu-ATP produce la liberación de GnRH, es diferente al mecanismo por el cual el Mg-ATP provoca el mismo efecto (257).

4.2 MECANISMOS DE ACCION DE LA GnRH.

Los factores de liberación, incluyendo a la GnRH, provocan la liberación específica de las hormonas adenohipofisarias a través de mecanismos de acción idénticos (122).

La GnRH produce la liberación acentuada de LH de la adenohipofisis, después de un minuto de ser administrada ésta por vía intravenosa, por lo que resulta obvio que la estimulación neurohumoral es un prerrequisito para que la liberación de hormonas adenohipofisarias sea posible (24).

Se han realizado numerosos experimentos para determinar si la GnRH además de estimular la secreción, activa la síntesis de gonadotropinas. Lo que permanece por aclararse es, si este efecto es primario sobre la síntesis o bien es secundario a la secreción hormonal. Predominantemente, se ha fijado mucha atención en dilucidar qué mecanismos de acción son los que provocan la liberación de las gonadotropinas.

Un mecanismo de acción general (113,24), que se ha propuesto para la liberación de hormonas adenohipofisarias (LH y FSH) por medio de la GnRH y que coincide con el descrito para la mayoría de las hormonas peptídicas, puede resumirse de la siguiente manera: la molécula de la GnRH interacciona con sus receptores a nivel de gonadótropos hipofisarios estimulando la activación de la adenilato ciclase que a su vez aumenta la concentración intracelular de adenosinmonofosfato cíclico (cAMP). El cAMP intracelular activa a una proteína cinasa, la cual activa a otra enzima denominada fosforilasa cinasa, esta última defosforila algunas proteínas de la membrana celular alterando así la permeabilidad de ésta. La alteración en la permeabilidad de la membrana, trae como consecuencia, la entrada de Ca^{2+} al medio intracelular, paso indispensable para que se lleve a cabo la extrusión de los gránulos secretores que contienen almacenadas a las gonadotropinas.

4.2.1 INTERACCION CON RECEPTORES.

El concepto de la existencia de receptores sobre la superficie celular, como sitios de acción de hormonas peptídicas se originó a partir de muchos años de estudios realizados sobre los efectos hormonales. No fue sino hasta 1969, que se midió directamente la unión de hormonas hipotalámicas marcadas a sus receptores.

Como consecuencia de esto ha surgido el concepto de que debe haber receptores peptídicos para cada una de las hormonas hipotalámicas que, a su vez, estimulan o inhiben la liberación de hormonas hipofisarias(258).

Los receptores para hormonas peptídicas, son considerados como macromoléculas compuestas de proteínas de altos pesos moleculares que se encuentran en las membranas plasmáticas celulares (258).

El primer paso en la acción de una hormona peptídica es la unión con sus receptores (13,113,258). Este primer paso o fase de activación del receptor, puede ser estudiado por la medición de la unión de péptidos marcados a preparaciones de tejidos particulares, cuyo proceso sea rápido, reversible, saturable y de alta especificidad y afinidad (258-261).

Por supuesto la activación funcional del receptor requiere de una forma específica de enlace (cuantificado en términos

del número de sitios receptores y de afinidad de los mismos) para que pueda llevarse a cabo el evento efector, que pueda traer como resultado una alteración en el estado de la célula blanco que es cuantificado en términos de la eficacia o actividad intrínseca del ligando.

Aparentemente esta técnica, puede definir sitios que representen o no los receptores fisiológicos funcionales, Para este tipo de deficiencias en la técnica, se han realizado estudios con células intactas que han sido sometidas a una dispersión enzimática en los que se permite hacer una correlación entre la unión hormonal y la respuesta biológica.

Otra manera de determinar si un receptor corresponde a la actividad biológica intrínseca del ligando radioactivo con el que fué identificado, es mediante la adición al medio de ensayo, de una serie de ligandos no marcados con potencias relativas proporcionales a sus actividades biológicas in vivo que desplacen al ligando marcado (258,262).

A partir de estos estudios con radioligandos, se ha llegado a la conclusión de que existe un exceso de receptores, por lo que una pequeña fracción de éstos, debe ser ocupada para proporcionar una respuesta máxima de secreción (13).

Recientemente se ha demostrado que sólo el 25% de la secuencia natural de GnRH marcada (I^{125} -GnRH) se une a sitios

de alta afinidad ($K_a = 10^9 M^{-1}$), estos son los representantes de los receptores fisiológicamente activos para la GnRH (263, 264). Estudios anteriores han demostrado que la mayoría de las uniones de la ^{125}I -GnRH a preparaciones de membranas hipofisarias están asociadas con sitios de baja afinidad ($K_a = 10^6 M^{-1}$) de significado fisiológico incierto (263-265).

Se ha propuesto que la unión de la GnRH a sitios de baja afinidad podría representar la unión a peptidasas asociadas a la membrana plasmática, que pudiesen contribuir a la rápida degradación de la GnRH. Al principio esto complicó la valoración de los receptores cuando se utilizaba a la GnRH como radioligando, pues mediante este procedimiento no se lograba diferenciar entre los receptores de alta y baja afinidad. Estos problemas se lograron resolver con el uso de péptidos sintéticos resistentes a la degradación que no se unen a los receptores de baja afinidad (263-265).

Con respecto a la localización de estos receptores, se ha discutido mucho la proposición que considera a la membrana plasmática como la única fuente o "locus predominante" de receptores para la GnRH.

Sternberg y Petrolí (266) demostraron por medio de estudios inmunohistológicos la presencia en los gonadótropos de gránulos con receptores específicos a la GnRH. También por

medio de autoradiografías microscópicas se ha demostrado que, después de una inyección de superanálogo $^{125}\text{I-D-Ala-desGly}^{10}$ proestilamida GnRH se induce la asociación de granos tanto a la membrana plasmática como a lisosomas y vesículas secretoras (266). Estas observaciones pueden ser interpretadas como una demostración del ingreso del complejo receptor-GnRH o bien de la existencia de sitios intracelulares de la unión para la GnRH de importancia fisiológica incierta (266).

Ahora bien, si los receptores pueden ser englobados de la superficie celular al interior de un organelo intacto, estos receptores ya no pueden ser accesibles a la unión de radioligandos y consecuentemente no es posible su detección por este tipo de ensayos; sin embargo, al efectuar la lisis de gránulos y lisosomas antes de los estudios radioactivos, no se ha podido observar un aumento en el número de receptores específicos a la GnRH (266). No se ha observado una alteración significativa de la liberación de la LH, usando compuestos que bloquean la penetración del complejo receptor-GnRH, del tipo de la vinblastina (268). En conjunto estas observaciones indican que la estimulación de la liberación de las gonadotropinas está mediada por la unión en la superficie del gonadotrofo y que no requiere de internalización (266-268).

Puede observarse entonces que los receptores a nivel de mem

brana son los responsables de la secreción de gonadotrofinas mientras que la internalización del complejo ligando-receptor, más que representar un sitio de acción intracelular para la GnRH, podría formar parte del mecanismo regulador de la concentración de receptores a nivel de membrana plasmática (266, 267).

El número de receptores hipofisarios para la GnRH cambia marcadamente bajo diferentes condiciones fisiológicas: varían durante la maduración sexual, durante el ciclo estral y se ha demostrado que la capacidad es máxima cuando la respuesta de gonadotrofinas para la GnRH es máxima (269). La capacidad de unión para la GnRH aumenta después de la castración cuando aparentemente la concentración de GnRH hipotalámica disminuye y la GnRH en sangre aumenta (270).

Todavía hay incertidumbre sobre el posible mecanismo responsable del incremento del número de receptores después de la gonadectomía. Debido a que la GnRH exógena y los superanálogos agonistas pueden incrementar el contenido de receptores a la GnRH en las hipófisis intactas de ratas machos, se ha sugerido que el incremento de GnRH endógena puede regular la formación de sus propios receptores (270, 271).

La evaluación de GnRH inmunorreactiva en el plasma porta hipofisario después de la gonadectomía ha dado apoyo a la i-

dea de que esta neurohormona se incrementa en este estado fisiológico y que el aumento puede ser prevenido mediante la administración adecuada de esteroides sexuales(272-274). Por otra parte, los estudios realizados en ratas y carneros, a los cuales se les administró un suero antiGnRH, se observó que no solo se disminuía la liberación de gonadotropinas sino que también se presentaba una disminución en la capacidad de respuesta y en la captación de GnRH de los gonadótrofos.

En estudios similares, pero utilizando animales gonadectomizados, la respuesta de las gonadotropinas, observada normalmente se logra prevenir con la administración de suero antiGnRH. En estos animales también se observó una disminución del contenido de receptores específicos a la GnRH. Estos resultados también apoyan a la idea de que en realidad la GnRH controla la posible formación de sus propios receptores(275).

También se ha propuesto que la desensibilización hipofisaria producida a base de un tratamiento continuo de GnRH o sus análogos, es debida a un proceso intrínseco a la misma glándula (276).

Como resultado de los estudios in vivo e in vitro, se ha llegado a pensar que esta desensibilización se debe a una disminución del número de receptores de alta afinidad conduciendo este fenómeno a una eliminación de la capacidad de respuesta

de los gonadotrofos a la GnRH (276,277).

En la actualidad los gonadotrofos de la glándula pituitaria anterior, se les considera como células dinámicas en la cual su habilidad para responder a la GnRH y la sensibilidad de esta respuesta varía regularmente a través del ciclo reproductor (278).

Esta variabilidad ha sido evaluada durante los ciclos ovulatorios de roedores, rumiantes y primates (279-282). Se ha podido demostrar que existe, durante el ciclo sexual una estrecha correlación entre el contenido de receptores a la GnRH y la capacidad de liberación de las gonadotrofinas por los gonadotrofos de la hipófisis (283-286).

Los mecanismos intracelulares que se han propuesto como traductores de la señal inicial que se genera por la interacción ligando-receptor, son similares a aquellas respuestas de tipo secretor efectuadas en otro tipo de células nerviosas y endócrinas(113).

La descripción de la naturaleza y secuencia de los eventos celulares que prosiguen a la unión de una hormona liberadora a su receptor y que culminan con la liberación de gonadotrofinas, requiere aún de mucha investigación.

La estimulación de la liberación de gonadotrofinas por la GnRH₂ es un mecanismo que depende y requiere de energía

(287), y que probablemente involucra cambios en la permeabilidad de la membrana, en la distribución de Ca^{2+} y en los niveles de los nucleótidos cíclicos (13,288).

4.2.2 INTERACCION POSTRECEPTOR.

Se ha sugerido que el monofosfato cíclico de la adenosina (cAMP) tiene una función importante en el control de la liberación de las gonadotropinas. Hay pruebas definitivas que indican que el sistema de la adenilil ciclasa, es un mediador de la acción de la GnRH. Es bien sabido que, la adición de esta neurohormona provoca la estimulación de la acumulación del cAMP en la hipófisis anterior de la rata (in vitro) (13,113,289-293).

La observación de que la teofilina, un inhibidor de la fosfodiesterasa de los nucleótidos cíclicos y algunos derivados del cAMP (294,295) tienen un efecto estimulante sobre la liberación de la LH, es una evidencia más de que el cAMP participa en el control de la secreción de las gonadotropinas. Las pruebas de que la GnRH ejerce una acción a través de la activación de la adenilil ciclasa y no por la inhibición de la fosfodiesterasa de los nucleótidos cíclicos, está indicado por la observación de que los efectos de la neurohormona son similares en presencia o ausencia de la teofilina (13,113,288,290).

Una revisión reciente, ha reiterado un modo de acción para la GnRH, en la cual el paso clave es la activación de una proteína cinasa dependiente del cAMP, que cataliza la fosforilación de la fosforilasa cinasa. Esta enzima se encarga aparentemente de fosforilar sustratos proteicos hipofisarios. Esto es seguido por una acción definida de la subunidad catalítica de la cinasa que induce a la exocitosis(288,289)(ver figura 4.6)

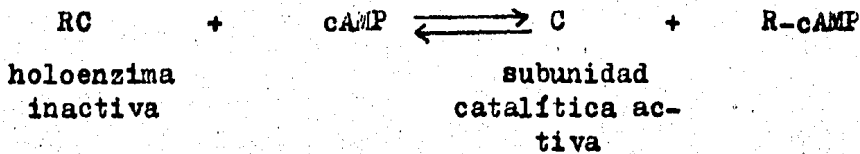


Figura 4.6

Se ha observado en algunos reportes, que la GnRH es capaz de elevar los niveles de cGMP, pero parece ser que este nucleótido no es un mediador de la liberación de las gonadotrofinas (13,113,289,296). Es posible que la GnRH inicie una serie de señales químicas que provoquen la formación de cGMP independientemente de la liberación de gonadotrofinas (291).

Como se mencionó anteriormente, la secreción de las hormonas hipofisarias es dependiente de la concentración de iones calcio. Hay autores que proponen que es la concentración extracelular la requerida para una respuesta normal a la GnRH

(296), aunque otros han sugerido que es la concentración intracelular la que es necesaria para evocar la respuesta fisiológica (296). Los datos más recientes (13,289,296-298), han demostrado que la concentración de Ca^{2+} extracelular es prerrequisito para la acción de la GnRH sobre la liberación de gonadotropinas e independiente sobre la acumulación de cGMP. Los iones Ca^{2+} , son capaces de disminuir la constante de activación (K_{act}), incrementando así la sensibilidad a la GnRH (296). Sin embargo el Ca^{2+} no es necesario para la unión de la GnRH con sus receptores por lo que el efecto estimulante sobre la sensibilidad del gonadótrofo debe ser ejercida en un "locus post receptor" (296,298).

Se ha demostrado que incrementar la permeabilidad de los canales de calcio dependientes del voltaje de la membrana provoca un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , este aumento puede ser el iniciador de los eventos intracelulares que conducen a la excitación (297). Esto último explica por qué los iones K^+ juegan un papel importante en la depolarización de la membrana y en el aumento de la captación de Ca^{2+} (297,299).

Concomitantemente a las variaciones del potencial de la membrana una pequeña cantidad de Ca^{2+} penetra con los iones Na^+ a través de los canales al sodio "rápidos", que son abier-

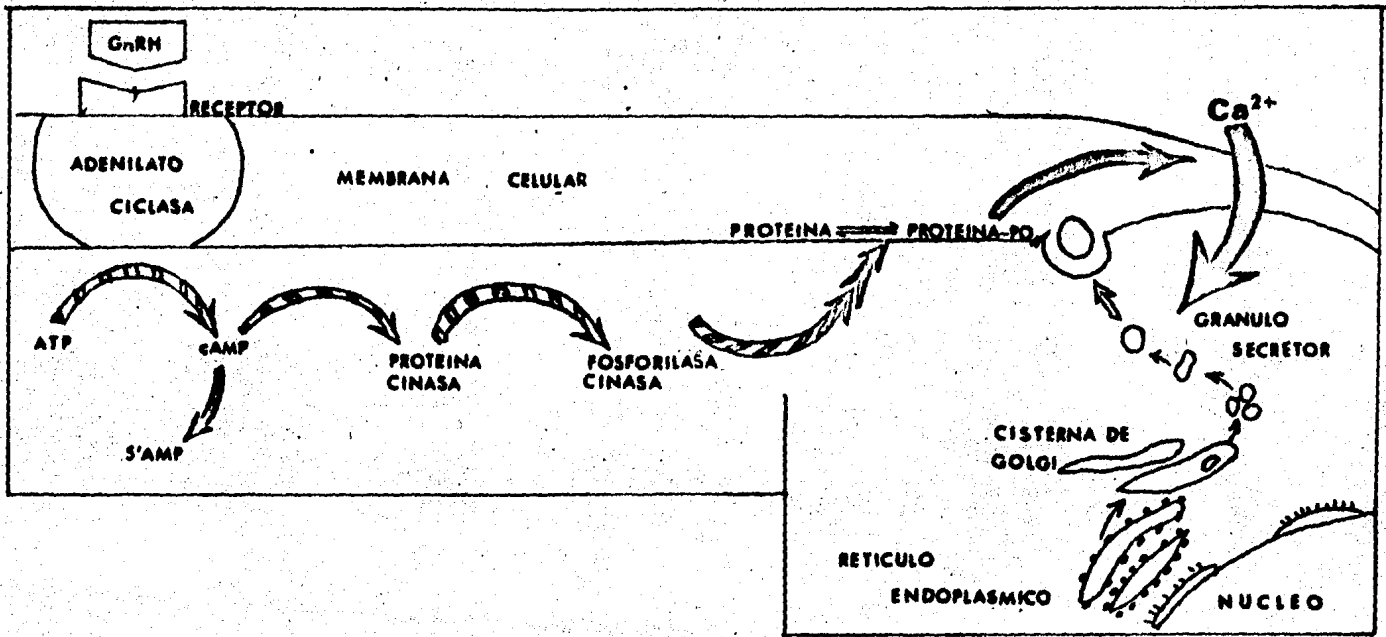


Figura 4.7 Mecanismo de acción de la GnRH.

tos por un período de tiempo corto. La activación de estos canales da lugar a una depolarización de la membrana dependiente del Na^+ y a la apertura de canales al Ca^{2+} dependientes del voltaje. A través de estos canales el Ca^{2+} entra y promueve la liberación del peptido sintetizado (297, 298). El mecanismo de acción de estos agentes depolarizantes en los gonadotrofos es similar al reportado en tejido nervioso (298).

4.3 ACCIONES EXTRAHIPOFISIARIAS DE LA GnRH.

A pesar de que la GnRH es la encargada de modular el control hipotalámico ejercido sobre la glándula pituitaria, es decir, modular la secreción de gonadotropinas, esta neurohormona es capaz de actuar extrahipofisiariamente a nivel de gónadas.

Estas afirmaciones se han basado en el descubrimiento de receptores de alta afinidad presentes tanto en el ovario como en testículo (300-302), así como de los estudios en cultivos celulares in vitro (300-304) y de estudios efectuados in vivo en animales hipofisectomizados (305).

Se ha observado que la administración repetida o continua de dosis farmacológicas de GnRH o sus análogos agonistas causa efectos paradójicos de infertilidad en varias especies, incluyendo a primates y humanos (304, 306, 307). La GnRH así ad-

ministrada induce a la interrupción de ciclos reproductivos normales, debido a la desensibilización tanto hipofisiaria como gonadal.

Inicialmente, se supuso que estos efectos paradójicos a nivel gonadal eran el resultado solamente de una liberación excesiva de LH, que a su vez producía una desensibilización (down regulation) de sus propios receptores a nivel ovárico. El hecho de que los niveles altos de LH disminuían abruptamente a pesar de la administración continua de GnRH y de la ocurrencia de acciones antigonadales en ratas hipofisectomizadas, sugirió la existencia de acciones directas de la GnRH a nivel gonadal (300, 311, 312).

La acción directa de la GnRH o sus agonistas sobre las gónadas de rata incluye:

4.3.1. Prevención del aumento del peso ovárico inducido por la hCG en animales hipofisectomizados.

El examen histológico de los ovarios tratados con GnRH, revela cambios morfológicos profundos que resultan en una disminución del peso, que es reflejo de la existencia de una gran cantidad menor de folículos antrales y una reducción del volumen antral. También se observó un aumento en la luteinización de células granulosa, sugiriendo que la GnRH induce la luteinización prematura y la presencia de oocitos atípicos (313).

4.3.2. Prevención del desarrollo folicular inducido por la FSH.

Las acciones de la FSH sobre la diferenciación de las células de la granulosa ovárica, incluyen la síntesis de la progesterona, la inducción de receptores para la LH y la PRL y la maduración morfológica celular, actividades que se sabe están mediadas por mecanismos dependientes del cAMP.

La GnRH y sus agonistas inhiben estas acciones in vitro en cultivos de células de la granulosa aumentando el catabolismo del cAMP en dichas células, estimulando a la fosfodiesterasa tanto de baja como de alta afinidad por el sustrato. Este efecto contrarresta progresivamente la actividad del sistema de la adenilil ciclase (305,314).

Estos hechos muestran una disminución en la capacidad de respuesta ovárica a la FSH, modificando la habilidad del mecanismo enzimático para responder a la estimulación gonadotrófica (305,315). Como el cAMP es el mediador de la acción de la FSH sobre la diferenciación de las células de la granulosa, la supresión de la acumulación de este nucleótido por la GnRH o sus análogos, es probablemente el origen de la acción inhibidora de este neuropeptido sobre la maduración celular in vitro inducida por la FSH (314). Estas acciones inhibitorias de la GnRH sobre la actividad de la FSH además de alterar al sistema de la adenilil ciclase provienen de una disminución de

los receptores para la FSH que puede involucrar la internalización de éstos o bien una disminución de la síntesis de nuevos receptores (305).

4.3.3. Prevención del desarrollo de receptores para la LH en folículos preovulatorios así como de la esteroidogénesis (ovárica y testicular).

La adquisición de receptores para la LH en las células granulosa, representa un paso muy importante en la diferenciación y maduración de las mismas y es esencial para la preparación del folículo de Graaf antes de que se produzca el surgimiento preovulatorio de LH y FSH, así como la síntesis de progesterona. Se ha confirmado tanto in vivo como in vitro, que es la FSH la inductora de estos receptores (25,302,312). Por lo tanto la administración de dosis farmacológicas de GnRH o sus agonistas, inhibe esta diferenciación de las células ováricas e interfiere con la habilidad de estas células de responder al surgimiento preovulatorio de LH (316).

Como las concentraciones periféricas de la GnRH se ha visto que son menores de 10^{-11} M (317), el control hipotalámico directo sobre la función ovárica (mediado por la GnRH) no es probable que ocurra en individuos endocrinológicamente normales. Sin embargo, una producción local de GnRH podría ser posible y un control paraendócrino de la función luteinizante

no podrían ser descartados (302, 317). Es más, se ha descubierto la existencia de una sustancia con estructura parecida a la GnRH en el ovario de la rata: la gonadocrinina. Esta sustancia se encuentra presente en folículos maduros y se ha sugerido que el aumento de esta sustancia (o bien de la GnRH) actúe previniendo la maduración de otros folículos o bien induciendo la atresia de folículos preexistentes. Así, la estimulación inicial de la diferenciación folicular efectuada por la FSH, podría estar terminada por la acción reguladora de la gonadocrinina (302, 314).

Se ha observado también, un efecto inhibitorio de la GnRH y sus agonistas sobre la inducción de la actividad de la aromatasas estimulada por la FSH (313, 315) con un bloqueo subsecuente de la producción esteroidea.

Puesto que la GnRH no inhibe la acumulación de cAMP inducida por la enterotoxina del cólera o bien por la hCG (306, 318, 319), muchos investigadores han propuesto que la inhibición de la esteroidogénesis por esta neurohormona se efectúa en una etapa posterior a la que se observa la acumulación de cAMP.

Otro posible sitio de acción de la GnRH para bloquear la síntesis esteroidea, es a nivel de la membrana celular, impidiendo el transporte del éster del colesterol, sustrato nece-

sario para la síntesis de los esteroides (318,319).

En las ratas macho, la GnRH también produce un efecto bi fásico sobre la secreción de la LH (320-322): el incremento inicial de LH provoca una ocupación momentánea de los receptores lo cual produce un aumento de testosterona y una consecuente disminución en el contenido inicial de receptores. Este aumento de testosterona es atribuido a la acción trófica de LH produciendo efectos estimulantes en el transporte o en la actividad enzimática de los sitios productores de los precursores esteroidales (311, 319, 321, 323, 324).

Posteriormente se observa una pérdida marcada en el contenido de receptores (más del 50%) que ya no es causado por la LH, pues esta disminuye abruptamente después del pico inicial. Esta pérdida de receptores es debida aparentemente a una acción de la GnRH a nivel gonadal. Además, se observa una dis minución en la síntesis y secreción de testosterona in vitro, a pesar de adicionar al medio hCG, enterotoxina del cólera y dibutiril-cAMP (dbcAMP) en concentraciones altas, lo que indica que la GnRH bloquea la esteroidogénesis de la misma manera como sucede en las ratas hembras. Se ha sugerido que el bloqueo es a nivel del paso de la 17,20 desmolasa (este es el primero y más vulnerable paso del sistema enzimático que puede ser afectado) (311, 319, 321, 323, 324).

Podemos concluir, entonces, que la inhibición de la esteroidogénesis observada en respuesta a la administración de GnRH es un efecto secundario a los pulsos de LH liberados, y principalmente proviene de un efecto inhibitorio directo de la GnRH sobre la esteroidogénesis gonadal.

Estos efectos inhibidores de la GnRH sobre la esteroidogénesis gonadal, presuponen la existencia de receptores para la GnRH a nivel de las células gonadales, aunque estos receptores no se encuentran uniformemente distribuidos, pues la GnRH puede inducir el aumento de sus propios receptores únicamente en células activas esteroidogénicamente, como las células de la granulosa y luteales en hembras y las células de Leydig en los machos (302).

Es importante hacer notar que los datos más recientes de los efectos de la GnRH sobre la esteroidogénesis en humanos difiere considerablemente de los efectos producidos en las ratas, pues en humanos, dosis altas de los agonistas de la GnRH, no provocan una supresión o disminución en la producción de esteroides inducidos por la FSH, sugiriendo que las células de la granulosa humanas y las de rata, difieren con respecto a las acciones extrahipofisiarias de la GnRH.

El efecto inhibitorio de la GnRH sobre la función de las células de la granulosa en las ratas, está mediado por recep-

tores de alta afinidad, mientras que en primates no se ha logrado determinar tales receptores en el cuerpo lúteo o en el testículo, adicionándose así otro argumento que demuestra la diferencia de especie con respecto a la acción de la GnRH en las gónadas (325, 326).

4.3.4. Estimulación de la síntesis de prostaglandinas.

No se sabe aún con certeza, si la GnRH aumenta la síntesis de las prostaglandinas (320, 327, 328), pero si se ha observado que tanto la GnRH, como las prostaglandinas (PGF_2) inhiben de manera muy similar la respuesta de las células luteales a la LH (329). Así tenemos la presencia de un efecto luteolítico, provocado al parecer por la administración de GnRH pero cuyo mecanismo aún no se ha dilucidado (312, 319, 320, 329, 330).

4.3.5 Estimulación de la maduración meiótica de los oocitos.

Los oocitos de los mamíferos se encuentran en reposo en la llamada fase dictiada de la primera profase meiótica, es decir, la maduración oocítica se reinicia en el folículo preovulatorio, como consecuencia del surgimiento de LH y FSH.

Se ha informado que la GnRH y sus análogos estimulan de una manera específica la meiosis in vitro dependiendo de la dosis y con un incremento en la acumulación de lactato (328). Sin embargo la dosis mínima efectiva de GnRH para que se

lleve a cabo este proceso ($0.1 \mu\text{g}$) parece estar muy lejos de las concentraciones endógenas fisiológicas circulantes de GnRH (331).

4.3.6 Estimulación de la síntesis de ácido fosfatídico y fosfatidilinositol en células luteales.

Los fosfolípidos son componentes primordiales de la membrana celular y parecen estar involucrados en las respuestas iniciales de muchos tipos de células a sus agentes reguladores específicos. Se ha demostrado que la GnRH y sus análogos aumentan la incorporación de ^{32}P a dos fosfolípidos que intervienen en el ciclo del ácido fosfatídico y del fosfatidilinositol, proponiéndose que estos lípidos están involucrados íntimamente con la acción extrahipofisiaria de la GnRH.

La modificación en el recambio de fosfatidilinositol puede servir como un transductor entre la unión de la GnRH a su receptor en membrana y los eventos intracelulares subsiguientes, que culminan con la expresión de los efectos de la GnRH sobre la función gonadal (332).

4.3.7 Estimulación de la producción del activador del plasminógeno.

Las células de la granulosa producen cantidades crecientes del activador del plasminógeno previamente a la ovulación y sólo los folículos destinados a ovular producen esta enzima

en mayores cantidades. Se ha demostrado que el plasminógeno debilita la pared folicular.

La GnRH y sus análogos son capaces de inducir la ovulación en ratas hipofisectomizadas, independientemente de hormonas hipofisiarias (327).

Esta acción de la GnRH se ha visto acompañada por un aumento en la PGE en el ovario. Existen datos de que las prostaglandinas son capaces de incrementar la producción del activador del plasminógeno en células de la granulosa. La acción ovulatoria de la GnRH podría estar mediada por la activación de este factor a través de la estimulación de las prostaglandinas (327).

Resumiendo tenemos que, durante la regulación fisiológica normal, la GnRH provoca la liberación de las gonadotropinas de la hipófisis, de forma que se mantiene la función cíclica reproductiva. Durante la administración crónica, la GnRH y sus análogos inhiben la esteroidogénesis gonadal y la ovulación, fenómenos que por lo inexplicable de su producción, fueron denominados al principio como efectos paradójicos de la GnRH (3).

En conjunto los estudios de las acciones extrahipofisarias han permitido el mejor entendimiento de fenómenos, como el de la ovulación, en el que la función de la GnRH era total

mente inesperado.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fink, G., M.S. Aiyre, M.G. Jamieson, S.A. Chiappa. Factors modulating the responsiveness of the pituitary gland in the rat with special reference to gonadotropin releasing hormone (GnRH). En: Hypothalamic Hormones. Editado por M. Motta, F.G. Crosignani, L. Martini. Academic Press. London. 1975. pp. 139-160
- 2.- Gordon, J.H., S. Reichlin. Changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone releasing factor during the rat oestrous cycle. *Endocrinology* 94:974-978. 1974
- 3.- Arimura, A., H. Matsuo, Y. Baba, L. Debeljuk, J. Sandow, A.V. Schally. Stimulation of release of LH by synthetic LH-RH in vivo : I. A comparative study of natural and synthetic hormones. *Endocrinology* 90:163-168. 1972.
- 4.- Redding, T.W., A.V. Schally, A. Arimura, H. Matsuo. Stimulation of release and synthesis of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in tissue cultures of rat pituitaries in response to natural and synthetic LH and FSH releasing hormone. *Endocrinology* 90:764-770. 1972
- 5.- Schally, A.V., T.N. Redding, H. Matsuo, A. Arimura. Stimulation of FSH and LH release in vitro by natural and synthetic LH and FSH releasing hormone. *Endocrinology* 90:1561-1568, 1972
- 6.- Dowd, A.J., A.L. Barofsky, N. Chaudhri, C.W. Lloyd, J. Weisz. Patterns

of LH and FSH release from perfused rat pituitaries in response to infusions of hypothalamic extract. *Endocrinology*. 96:243-252. 1975

- 7.- Tang, L.K.L., H.G. Spies. Effects of gonadal steroids on the basal and LRF-induced gonadotropin secretion by cultures of rat pituitary. *Endocrinology* 96:349-356. 1975.
- 8.- Arimura, A., L. Debeljuk, M. Shiino, E.G. Rennels, A.V. Schally. Follicular stimulation by chronic treatment with synthetic LH releasing hormone in hypophysectomized female rats bearing pituitary grafts. *Endocrinology* 92: 1507-1514. 1973
- 9.- Debeljuk, L., A. Arimura, M. Shiino, E. Rennels, A.V. Schally. - Effects of chronic administration with LH/FSH-RH in hypophysectomized pituitary grafted male rats. *Endocrinology* 92:921-930. 1973
- 10.- Chapped, S.C., C.A. Barraclough. Hypothalamic regulation of pituitary FSH secretion. *Endocrinology* 98:927-935. 1976
- 11.- Arimura, A., L. Debeljuk, A.V. Schally. Stimulation of FSH release in vivo by prolonged infusion of synthetic LH-RH. *Endocrinolog* 91:529-532. 1972
- 12.- Reichlin, S., R. Saperstein, I.M.D. Jackson, A.E. Boyd III, Y. Patel. Hypothalamic Hormones. *Ann. Rev. Physiol.* 38:389-424 1976.

- 13.- Vale, W., C. Rivier, M. Brown. Regulatory peptides of the hypothalamus. *Ann. Rev. Physiol.* 39:473-527. 1977.
- 14.- Weilliu, K., G. L. González, G. H. Williams, J. Weiz. Response of the perfused anterior pituitaries of rats to synthetic gonadotropin releasing hormone: a comparison with hypothalamic extract and demonstration of a role for potassium in the release of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone. *Endocrinology* 101:1444-1454. 1977
- 15.- Werbec, R. B., L. Debeljuk, J. Dunn, A. V. Schally, A. Arimura, H. Sato, T. Kumasaca. Production of antiserum to LH-RH associated with gonadal atrophy in rabbits: development of radioimmunoassays for LH-RH. *Endocrinology.* 93:1092-1103. 1973
- 16.- Arimura, A., L. Debeljuk, A. V. Schally. Blockade of preovulatory surge of LH and FSH and of ovulation by anti-LH-RH serum in rats. *Endocrinology* 95:323-325. 1974.
- 17.- Takahashi, M., J. J. Ford, K. Yoshinaga, R. O. Greep. Effects of cervical stimulation and anti-LH releasing hormone serum on LH releasing hormone content in the hypothalamus. *Endocrinology* 96:453-457. 1975.
- 18.- De La Cruz, A., A. Arimura, K. C. de la Cruz, A. V. Schally. Effects of administration of antiserum to LH-RH on gonadal function during the estrous cycle in the hamster. *Endocrinology* 98:490-497. 1976.

- 19.- Arimura, A., M. Shino. Effect of active and passive immunization with LH-RH on serum LH and FSH levels and the ultrastructure of pituitary gonadotrophs in castrated male rats. *Endocrinology*. 99:291-303. 1976.
- 20.- Evans, J.S. Local intravascular infusion with porcine hypothalamic extract changed the cytology and stimulated the secretory activity of rat pituitary autografts. *Endocrinology* 90:123-130. 1972.
- 21.- Baker, B.L., W.C. Dermody. Effect of hypophysectomy on immunocytochemically demonstrated gonadotropin releasing hormone in the rat brain. *Endocrinology* 98:1116-1122. 1976
- 22.- Nishi, N., A. Arimura, K.G. de la Cruz, A.V. Schally. Termination of pregnancy by sheep antiLH-RH gammaglobulin in rats. *Endocrinology* 98:1024-1030. 1976.
- 23.- Blabe, C.A., R.P. Krich. Administration of antiluteinizing hormone-releasing hormone serum to rats: effects on periovulatory secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone. *Endocrinology* 109:2175-2179. 1981
- 24.- McCann, S.M., Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. *N. Engl. J. Med.* 296:797-802. 1977.
- 25.- Fritz, M.C.J., Speroff. The endocrinology of the menstrual cycle: the interactions of folliculogenesis and the neuroendocrine mechanisms. *Fertil. Steril.* 33:509-529. 1982.

- 26.- Franchimont, P., H. Burger. Human growth hormone and gonadotropins in health and disease. North Holland Publishing Co. Amsterdam. 1975. pp: 125-182.
- 27.- Gallo, R.V., Electrical correlates of gonadal regulation. En *Endocrinology*. Editado por R.O. Scow. Excerpta Medica Amsterdam. pp:87-91
- 28.- Norman, R.L., J.A. Resko, H.G. Spies. The anterior hypothalamus: how it affects gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 99:59-71. 1976
- 29.- Flerko, B. The hypophysiotropic area and its regulation. En *Endocrinology*. Editado por R.O. Scow. Excerpta Medica Amsterdam. 1973. pp. 63;66.
- 30.- Davidson, J.M., C. Cheung, E.R. Smith, D. Damasa, P. Jongston. Feedback mechanisms in relation to reproduction. En *Endocrinology*. Editado por R.O. Scow. Excerpta Medica Amsterdam. 1973. pp. 191-196.
- 31.- Cooper, K.J., S.M. McCann. Influence of ovarian steroids on pituitary responsiveness to LH-releasing hormone (LH-RH) - in the rat. En *Hypothalamic Hormones*. Editado por M. Motta, P.G. Crosignani, L. Martini. Academic Press. 1975. pp. 161-168
- 32.- Guillemin, R. Hypothalamic factors releasing pituitary hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* 20:89-130. 1964.

- 33.- McCann, S.M., V.D. Ramirez. The neuroendocrine regulation of hypophysal luteinizing hormone secretion. Recent Prog. Horm. Res. 20:131-181. 1964
- 34.- Schwarts, N.B. Newer concepts of gonadotropins and steroid feedback control mechanisms. En Gynecologic Endocrinology Editado por J.J. Gold. Second Edition. Harper and Row Pub. 1975. pp. 29-42.
- 35.- Schwarts, N.B. A model for the regulation of ovulation in the rat. Recent Prog. Horm. Res. 25:1-41. 1969
- 36.- Wise, P.M., A. Ratner. Effect of ovariectomy on plasma LH, FSH, Estradiol and Progesterone and medial basal hypothalamic LH-RH concentrations in old and young rats. Neuroendocrinology 30:15-19. 1980.
- 37.- De Paolo, L.V., S.M. McCann, A. Negro-Vilar. Sex difference in the activation of hypothalamic catecholaminergic and luteinizing hormone releasing hormone peptidergic neurons after acute castration. Endocrinology 110: 531-539. 1982
- 38.- Stevens, V.S., S.J. Sparks, J.E. Powell. Levels of estrogens, progesterone and LH during the menstrual cycle of the baboon. Endocrinology 87:658-666. 1970
- 39.- Jonathan, N.B., R.E. Mical, J.D. Porter. Superfusion of hemipituitaries with portal blood. I. LRF. secretion in castrated and diestrous rats. Endocrinology 93:497- 503. 1973

- 40.- Adams, T.E., R.L. Norman, H.G. Spies. Gonadotropin-releasing hormone receptor binding and pituitary responsiveness in estradiol primed monkeys. *Science* 213:1388-1390. 1981.
- 41.- Sbhally, A.V., T.W. Redding, A. Arimura. Effect of sex steroids on pituitary secretion responses to LH and FSH releasing hormone in vitro. *Endocrinology* 93:893-902. 1973
- 42.- Araki, S.M., M. Ferin, B.A. Zimmerman, H.L. Vande Wieli. Ovarian modulation of immunoreactive gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the rat brain: evidence for a differential effect on the anterior and midhypothalamus. *Endocrinology* 96:644-650. 1975
- 43.- Legan, S.J., F.J. Karsch. Modulation of pituitary responsiveness to luteinizing hormone releasing factor during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 96: 571-575. 1975
- 44.- Schally, A.V., A.F. Parlow., N.H. Carter, M. Saito, C.Y. Bowers, A. Arimura. Studies on the site of action of oral contraceptive steroids. II. Plasma LH and FSH levels after administration of antifertility steroids and LH-releasing hormone (LH-RH). *Endocrinology* 86:530-541. 1970
- 45.- Barraclough, C.A., E.W. Haller. Positive and negative feedback effects of estrogen on pituitary LH synthesis and release in normal and androgen-sterilized female rats. *Endocrinology* 86:542-551. 1970

- 46.- Knobil, E. On the control of gonadotropin secretion in the Rhesus Monkey. *Recent. Prog. Horm. Res.* 30:1-46. 1974
- 47.- Young, J.R., R.B. Jaffe. Strength-duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin responses to gonadotropin releasing hormone in women. II. Effects of varying concentrations of estradiol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42: 432-442. 1976.
- 48.- Karsch, F.J., R.F. Weick, W.K. Butler, D.J. Dierschke, L.C. - Krey, G. Weiss, J. Hotchkiss, T. Yarraji, E. Knobil. Induced LH surges in the rhesus monkey: strength duration characteristics of the estrogen stimulus. *Endocrinology* 92:1740-1747. 1973
- 49.- Kerdelhue, B., S. Catin, C. Kordon, M. Jutisz. Delayed effects of in vivo LH-RH immunoneutralization on gonadotropin and prolactin secretion in female rat. *Endocrinology.* 98:1539-1549. 1976.
- 50.- De Paolo, L.V., S.M. McCann, A. Negro-Vilar. A sex difference in the activation of hypothalamic catecholaminergic and luteinizing hormone releasing hormone peptidergic neurons after acute castration. *Endocrinology* 110:531-539. 1982
- 51.- Schally, A.V., W.H. Carter, M. Saito, A. Araura, C.Y. Bowers. Studies on the site of action of oral contraceptives. I. Effect of antifertility steroids on plasma LH levels and on

response to luteinizing hormone-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 28:1747-1755. 1968 .

- 52.- Maruca, J., H. E. Kulin, E. J. Santner. Perturbations of negative feedback sensitivity in gonadal patients undergoing estrogen replacement therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56: 53-59. 1983.
- 53.- Ferin, M., H. Rosenblatt, P. W. Carmel, J. L. Antunes, R. L. Vandewiele. Estrogen induced gonadotropin surges in female rhesus monkey after pituitary stalk section. *Endocrinology* 104: 50-52. 1979.
- 54.- Nakai, Y., T. M. Plant, D. L. Hess, E. J. Keogh, E. Knobil. On the sites of the negative and positive feedback actions of estradiol in the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 102:1008-1014. 1978
- 55.- Plant, T. M., Y. Nakai, P. Belchetz, E. Keogh, E. Knobil. The sites of actions of estradiol and phentolamine in the inhibition of the pulsatile, circadian discharges of LH in the rhesus monkey (*Macaca Mulatta*). *Endocrinology* 102: 1015-1018. 1978
- 56.- Ferin, M., H. Rosenblatt, P. W. Carmel, J. L. Antunes, R. L. Vandewiele. Estrogen induced gonadotropin surges in female rhesus monkey after pituitary stalk section. *Endocrinology* 104:50-52. 1979

- 57.- Knobil, E., T.M. Plant, L.Wildt, P.E.Belchets, G.Marshall.
Control of the rhesus monkey menstrual cycle: permissive
role of hypothalamic gonadotropin releasing hormone.
Science 207:1371-1373. 1980
- 58.- Yen, S.C.C., G.Vandenberg, T.M.Siker. Modulation of pituitary
responsiveness to LRF by estrogen. J.CLIN.Endocrinol.
Metab. 39:170+177. 1974
- 59.- Keys, W.R., R.B.Jaffe. Modulation of pituitary gonadotropin
response to gonadotropin releasing hormone by estradiol.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 38:805-810. 1974
- 60.- Jaffe, R.B., W.R.Keys. Estradiol augmentation of pituitary
responsiveness to gonadotropin releasing hormone in wo-
men. J.Clin.Endocrinol.Metab. 39:850-855. 1974
- 61.- Knobil, E. The neuroendocrine control of the menstrual
cycle. Recent Prog.Horm.Res. 36:53-88. 1974.
- 62.- Adams, T.E., H.G.Spies. Binding characteristics of gonado-
tropin releasing hormone receptors throughout the estrous
cycle of the hamster. Endocrinology 108:2245-2253. 1981.
- 63.- Ferland, L., B.Marchetti, C.Ceguin, F.A.Lefebvre, J.J.Reeves,
F.Labrie. Dissociated changes of pituitary luteinizing -
hormone releasing hormone (LH-RH) receptors and responsi-
veness to the neurohormone induced by 17-Beta-estradiol
and LH-RH in vivo in the rat. Endocrinology 109:87-92. 1981

- 64.- Adams, T.E., R.L.Norman, H.G.Spies. Gonadotropin releasing hormone receptor binding and pituitary responsiveness in estradiol primed monkeys. Science 213:1388-1390. 1981
- 65.- Chapped, S.C., L.A.Resco, R.L.Norman, H.G.Spies. Studies in rhesus monkey on the site where estrogen inhibits gonadotropins: delivery of 17-Beta-estradiol to the hypothalamus and pituitary gland. J.Clin.Endocrinol.Metab. 52:1-8 1981.
- 66.- Szataarczyk, A., M.Henry, E.Laplant, G.Ixart, I.Assenmacher, C.Kordon. Temporal relationships between the circadian rhythmicity in plasma levels of pituitary hormones and in the hypothalamus concentrations of releasing factors. Neuroendocrinology 30: 369-376. 1980
- 67.- Arimura, A., A.J.Kastin, A.V.Schally, M.Saito, T.Kumasaka, Y.Yaoi, N.Nishi, K.Ohkura. Immunoreactive LH-releasing hormone in plasma: midcycle elevations in women. J.Clin.Endocrinol.Metab. 38:510-512. 1974
- 68.- Neill, L.D., J.M.Pattom, R.A.Dúley, R.C.Tsou, G.T.Tindall. Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in pituitary stalk blood of rhesus monkeys: relationship to level of LH release. Endocrinology 101:430-434. 1977
- 69.- Healy, D.L., H.G.Burguer. Serum follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and prolactin during the induction

of ovulation with exogenous gonadotropin. J.Clin.Endocrinol.Metab. 56:474-478. 1983

- 70.- Moghissi, K.S., F.N. Syner, T.N. Evans. A composite picture - of the menstrual cycle. A.J.Obstet.Gynecol. 114:405-418. 1972
- 71.- Helmond, F.A., P.A. Simons, P.R. Hein. The effects of progesterone on estrogen-induced luteinizing hormone and follicle stimulating hormone release in the rhesus monkey. Endocrinology 107:478-485. 1980
- 72.- March, C.M., R.P. Marrs, U. Goebelsman, D.R. Mischell. Feedback effects of estradiol in progesterone upon gonadotropin and prolactin release. Obstet.Gynecol. 58:10-18, 1981
- 73.- Dierschke, D.J., T. Yamaji, F.J. Karsch, R.P. Weick, G. Weiss, E. Knobil. Blockade by progesterone of estrogen induced LH and FSH release in the rhesus monkey. Endocrinology 92: 1496-1501. 1973
- 74.- Terasawa, E., W.E. Bridson, D.J. Weishar, L.V. Rubens. Influence of ovarian steroids on pituitary sensitivity to luteinizing hormone-releasing hormone in the ovariectomized guinea pig. Endocrinology 106:425-429, 1980
- 75.- Foxcroft, G.R., D.K. Pomerantz, A.V. Nalbandov. Effects of estradiol 17-Beta on LH-RH/FSH-RH induced and spontaneous LH release in prepubertal female pigs. Endocrinology 96:

551-557, 1975

- 76.- Hilliard, J., A.V. Schally, C.H. Sawyer. Progesterone blockade of the ovulatory response to intrapituitary infusion of LH-RH in rabbits. *Endocrinology* 730-736. 1971
- 77.- Arimura, A., A.V. Schally. Progesterone suppression of LH-releasing hormone-induced stimulation of LH release in rats. *Endocrinology* 87:653-657, 1970
- 78.- Wildt, L., J.S. Hutchison, G. Marshall, C.L. Pohl, E. Knobil. On the site of action of progesterone in the blockade of estradiol induced gonadotropin discharges in the rhesus monkey. *Endocrinology* 109:1293-1299, 1981
- 79.- Resko, J.A., L.E. Horton. Effects of progesterone on estrogen gonadotropin release in male rhesus macaques. *Endocrinology* 112:850-855, 1983
- 80.- Banie, N., P.M. Wise, C.A. Barraclough. Negative feedback effects of progesterone correlated with changes in hypothalamic norepinephrine and dopamine turnover rates, median eminence luteinizing hormone releasing hormone and peripheral plasma gonadotropins. *Endocrinology* 108:2194-2199, 1981.
- 81.- Labrie, F., J. Drouin, L. Ferland, L. Lagaté, M. Beaulieu, A. De Léan, P.A. Kelly, M.G. Caron, V. Raymond. Mechanisms of action of hypothalamic hormones in the anterior pituitary gland

- and specific modulation of their activity by sex steroids and thyroid hormones. 34:25-93,1978
- 82.- Swedloff,R.W.,P.C.Walsh,W.D.Odell. Control of LH and FSH secretion in the male.Evidence that aromatization of androgen to estradiol is not required for inhibition of gonadotropin secretion. Steroids 20:13-22, 1974
- 83.- Swedloff,R.S.,N.D.Odell. Feedback control of male gonadotropin secretion. Lancet 2:683-687,1968
- 84.- Ferland H.,J.Drouin,F.Labrie. Role of sex steroids in LH and FSH secretion in the rat.En the hypothalamus and endocrine functions. Editado por F.Labrie,J.Ment,G.Pelktier Plenum Press.1976. 191-209
- 85.- Drouin,J.,F.Labrie. Selective effect of androgen on LH - and FSH release in anterior pituitary cells in culture. Endocrinology 98:1528-1534,1978
- 86.- Santen,R.J.,C.W.Bardin. Episodic luteinizing hormone secretion in man. Pulse analysis,clinical interpretation, physiologic mechanisms,J.Clin.Invest. 52:2617-2628,1973
- 87.- Hirsch,E.,K.V.Ravnikar,I.Schiff,D.Tulchinsky,K.J.Ryan. Determinations of endogenous immunoreactive luteinizing hormone releasing hormone in human plasma.J.Clin.Endocrinol.Metab. 54: 602-607,1982
- 88.- Carmel,P.W.,S.Araki,M.Ferin, Pituitary stalk portal blood

- collection in rhesus monkeys: evidence for pulsatile release of gonadotropin releasing hormone. *Endocrinology* 99:243-248, 1976
- 89.- Mortimer, C.H., A.S. McNeilly. Radioimmunoassay and chromatographic similarity of circulating endogenous gonadotropin releasing hormone and hypothalamic extracts in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43:883-888, 1976
- 90.- Nankin, H.R., P. Troen. Repetitive luteinizing hormone elevations in serum of normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:558-560, 1971
- 91.- Dierschke, D.J., A.N. Bhattachaya, L.E. Atkinson, E. Knobil. Circular oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology* 87:850-853, 1970
- 92.- Baird, D.T., I. Swanson, R.J. Scaramuzzi. Pulsatile release of LH and secretion of ovarian steroids in sheep during the luteal phase of the estrous cycle. *Endocrinology* 98:1490-1496, 1976
- 93.- Gross, D., Effect of castration and steroid replacement on immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in the hypothalamus and preoptic area. *Endocrinology* 106:1442-1450, 1980
- 94.- Smith III, S.G., K.S. Matt, W.F. Prestowitz, M.H. Stetson. Regulation of tonic gonadotropin release in prepubertal hamsters

- ters. *Endocrinology* 110:1262-1267,1982
- 95.- Everett, J.W., L. Tyrey. Similarity of luteinizing hormone surges induced by medial preoptic stimulation in female rats blocked with pentobarbital, morphine, chlorpromazine or atropine. *Endocrinology* 111:1979-1985,1982
- 96.- Smith, W.A., R.L. Cooper, M. Conn. Altered pituitary responsiveness to gonadotropin releasing hormone in middle-aged rats with 4-day estrous cycles. *Endocrinology* 111:1843-1848,1982
- 97.- Dunn, J.D., A. Arimura, L. E. Scheving. Effect of stress on circadian periodicity in serum LH and prolactin concentration. *Endocrinology* 90:29-33,1972
- 98.- Belchetz, P. E., T.M. Plant, Y. Nakai, E.J. Keogh, E. Knobil. Hypophysal responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic GnRH. *Science* 202:631-633,1978
- 99.- Smith, M.S. Effect of pulsatile gonadotropin-releasing hormone on the release of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in vitro by anterior pituitaries from lactating and cycling rats. *Endocrinology* 110:882-891,1982
- 100.- Gay, V.L., N.A. Sheth. Evidence for a periodic release of LH in castrated male and female rats. *Endocrinology* 90:158-162,1972

- 101.- Yen, S.S.C., C.C. Tsai, G. Vandenberg, R. Rebar. Gonadotropin dynamics in patients with gonadal dysgenesis: a model for the study of gonadotropin regulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35:897-904, 1972
- 102.- Clarke, I.J., J.T. Cummins. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone and luteinizing secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111:1737-1739, 1982
- 103.- Adams, T.E., H.G. Spies. GnRH-induced regulation of GnRH concentration receptors in phenobarbital blocked hamster. *Biol. Reprod.* 25:298-306, 1981
- 104.- Sarkar, D.K., S.A. Ciappa, G. Fink. GnRH surge in proestrous rats. *Nature* 264:461-463, 1976
- 105.- Smith, W.A., P.M. Conn. GnRH-mediated desensitization of the pituitary gonadotrope is not calcium dependent. *Endocrinology* 112:408-410, 1983
- 106.- Badger, T.M., J.S. Loughlin, P.G. Nadaff. The luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) desensitized rat pituitary: luteinizing hormone responsiveness to LH-RH in vitro. *Endocrinology* 112:793-799, 1983
- 107.- Blake, C.A., Stimulation of the proestrous LH surge after infusion of LH-RH in phenobarbital-blocked rats. *Endocrinology* 98:451-460, 1976

- 108.- Clayton, R.N., K.J. Catt. Gonadotropin releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocrin. Rev.* 2: 186-195, 1981
- 109.- Santen, R.J., E.B. Ruby. Enhanced frequency and magnitude of episodic luteinizing releasing hormone discharge as a hypothalamic mechanism for increased luteinizing hormone secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48:315-321, 1979
- 110.- Wildt, L., A. Hausler, G. Marshall, J.S. Hotchinson, T.M. Plant, P.E. Bletchett, E. Knobil. Frequency and amplitude of gonadotropin releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 109:376-382 1981
- 111.- Neill, J.D., R.A. Dailey, R.C. Tson, L.E. Reichert. Immunoreactive LH-like material in serum of hypophisectomized and prepubertal monkeys: inactive in an in vitro LH bioassay. *Endocrinology*:100:856;861, 1977
- 112.- Marut, E.L., R.F. Williams, B.D. Cowarr, A. Kinch, S.P. Lerner, G.D. Hodgen. Pulsatile pituitary gonadotropin secretion during maturation of the dominant follicle in monkeys: estrogen positive feedback enhances the biological activity of LH. *Endocrinology* 109:2270-2272, 1981
- 113.- Evans, W.S., B.J. Boykin, D.L. Kaiser, J.L.C. Borges, M.O. Thorne

Biphasic luteinizing hormone secretion in response to gonadotropin releasing hormone during continuous perfusion of dispersed cells of rat anterior pituitary: changes in total release and the phasic components during estrous cycle. *Endocrinology* 112:535-542, 1983

114.- Morell, A.G., G. Gregoriadis, I.H. Scheinberg. The role of sialic acid in the determining survival of lipoproteins in the circulation. *J. Biol. Chem.* 246:1461-1466, 1971

115.- Varhall, E.V., J.L. Vaitukartis, G.T. Ross, J.W. Hickman, G. Ashwell. Effects of progressive desialylation on the rate of disappearance of immunoreactive HCG from plasma in rats. *Endocrinology* 89:11-15, 1971

116.- Peckham, W.D., T. Yamaji, D.J. Dierschke, E. Knobil. Gonadal function and the biological and physiological physicochemical properties of follicle stimulating hormone. *Endocrinology* 92:1660-1666, 1973

117.- Lobo, R.A., O.A. Kletzky, G.S. Dizeraga. Elevated serum bioactive luteinizing hormone (LH) concentrations in women with polycystic ovary syndrome (PCO). *Fertil. Steril* 37: 301-307, 1982

118.- Lumpkin, M., A. Negro-Vilar, P. Franchimont, S.M. McCann. Evidence for hypothalamic site of action of inhibitor to suppress FSH release. *Endocrinology* 108:1101-1104, 1981

- 119.- Keogh, E.J., V.W.K. Lee, G.C. Rennie, Selective suppression of FSH by testicular extracts. *Endocrinology* 98:997-1004, 1976
- 120.- Steinberg, A., E. Steinberg. Secretion of an FSH inhibiting factor by cultured sertoli cells. *Endocrinology* 99:918-921, 1976
- 121.- Labrie, F., M. Gotbaut, L. Lagasé, J. Massicotte, L. Ferland, N. Barden, J. Drouin, G. Lépine, J.C. Lissitzky, E. Raymond, P. Borgueat, M. Beaulieu, R. Veilleux. Mechanisms of action of hypothalamic hormones and interaction with peripheral hormones at the pituitary level. In *The endocrine functions of the brain*, Edited por M. Motta. Raven Press, N.Y. 1980 - pp. 207-231.
- 122.- Sato, T., M. Hirono, T. Jyujo, T. Iosaka, K. Taya, M. Igarashi. Direct action of prostaglandins on the rat pituitary. *Endocrinology* 96:45;49, 1975
- 123.- Arisawa, M., T. Makino, S. Izum, R. Lizuka. Effect of prostaglandin D₂ on gonadotropin release from rat anterior pituitary in vitro. *Fertil. Steril.* 39:93-96, 1983
- 124.- Harms, P.G., S.R. Ojeda, S.M. McCann. Prostaglandin-induced release of pituitary gonadotropins. *Endocrinology* 94:1459-1467, 1974
- 125.- Echolm, C., M.R. Clark, C. Magnasson, O. Psakson, W.J. Lemaire. -

Ovulation induced by gonadotropin-releasing hormone analog in hypophysectomized rats involves prostaglandins.

Endocrinology 110:288-290, 1982

- 126.- Ojeda, S.R., W.B. Campbell. An increase in hypothalamic capacity to synthesize prostaglandins E_2 presides the first preovulatory surge of gonadotropins. Endocrinology 111: 1031;1037, 1982
- 127.- Nalbandov, A.B. Hypothalamic hypophyseal system. In Gynecologic Endocrinology. Edited by J.J. Gold. Second Edition. Harper and Row Publishers. Meriland, pp. 15-28. 1975.
- 128.- McCann, S.M., E.D. Ramirez. The neuroendocrine regulation of hypophyseal luteinizing hormone secretion. Rec. Prog. Horm. Res. 20:131-181, 1964
- 129.- Lisk, R.D., L.R. Kennwischer. Light: evidence for its direct effect on hypothalamic neurons. Science 146:272;279, 1963
- 130.- Ganong, W.F., M.D. Shepherd, J.R. Wall. Penetration of light into the brain of mammals. Endocrinology 72:962-968, 1963
- 131.- Earnest, D.J., F.W. Turek. Role for acetylcholine in mediating effects of light on reproduction. Science 219:77-79, 1983
- 132.- Soules, M.R., C.B. Hammond. Female Kallman's syndrome evidence for a hypothalamic LH-RH deficiency. Fertil. Steril. 33:82;85, 1980

- 133.- Martin, W.H., A.D. Rogol, D.L. Kaiser, M.O. Thorner. Dopaminergic mechanisms and luteinizing hormone (LH) secretion. II. Differential effects of dopamine and bromocriptine on LH release in normal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52:650-656, 1981
- 134.- Ben, J., C. Oliver, H.J. Weiner, R.S. Mical, J.C. Porter. Dopamine in hypophyseal portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology* 100:452-458 1977
- 135.- Demarest, K.T., G.A. Johnston, R.E. Moore. Biochemical indices of catecholaminergic neuronal activity in the median eminence during the estrous cycle of the rat. *Neuroendocrinology* 32:24;27, 1981
- 136.- Knight, P.G., P.T. Francis, R.B. Hollman, R.T. Gladwell. Changes in hypothalamic monoamine concentrations accompany the progesterone induced release of luteinizing hormone in domestic hen. *Neuroendocrinology* 35:359-362, 1982
- 137.- Pavasuthipaisit, K., D.L. Hess, R.L. Norman, T.I. Adams, W.L. Baughman, H.G. Spies. Dopamine: effects on prolactin and luteinizing hormone secretion in ovariectomized rhesus macaques after transection of the pituitary stalk. *Neuroendocrinology* 32:42;49, 1981
- 138.- Kalra, P.S., S.P. Kalra, L. Krulich, C.P. Fawcett, S.N. McCann.

Involvement of norepinephrine in transmission of the stimulatory influence of progesterone on gonadotropin release. *Endocrinology* 90:1168-1176,1972

- 139.- Gallo, R.B., Effect of electrical stimulation of the dorso-medial hypothalamic nucleus on pulsatile LH release in ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 32:134-138,1981
- 140.- Heri, M., E.Lapalnte, C.Kordon. Participation of serotonin in the phasic release of luteinizing hormone. II. Effects of lesions of serotonin containing pathways in the central nervous system. *Endocrinology* 102:1019-1025,1978
- 141.- Bignon, A., C.T.Fischette, T.C.Rainbow, B.S.McEwen. Serotonin receptors modulation by estrogen in discrete brain nuclei. *Neuroendocrinology* 35:287;291,1982
- 142.- Simonovic, I., M.Motta, L.Martini. Acetylcholine and the release of the follicle stimulating hormone releasing factor. *Endocrinology* 95:1373-1379,1974
- 143.- Wardlaw, S.I., W.B.Wihrenberg, M.Ferin, A.G.Frantz. Failure of Beta-endorphin to stimulate prolactin release in the pituitary stalk section monkey. *Endocrinology* 107:1663-1666,1980
- 144.- Simonovic, I., M.Motta, L.Martini, Acetylcholine and the release of the follicle stimulating hormone releasing factor. *Endocrinology* 95:1373-1379,1974

- 145.- Ondo, J.G. Gamma aminobutyric acid effects on pituitary gonadotropin secretion. *Science* 186:738-739, 1974
- 146.- Kaiser, J.S., A. Arimura, A.V. Schally, M.J. Brownstein. Absence of luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) from catecholaminergic neurons. *Endocrinology* 96:523-525, 1975
- 147.- Dyer, R.G., Characteristics of neurons projecting directly to the region of the median eminence. In *Hypothalamic hormones*. Edited by M. Motta, P.G. Crosignani, L. Martini. Academic Press, London, 1975, pp. 169-182
- 148.- Drouva, S.B., R.P. Gallo. Catecholamine involvement in episodic luteinizing hormone release in adult ovariectomized rat. *Endocrinology* 99:651-658, 1976
- 149.- Ojeda, R.S., S.M. McCann. Evidence for participation of a catecholaminergic mechanism in the postcastration rise in plasma gonadotropins. *Neuroendocrinology* 12:295-301, 1973
- 150.- Cocchi, D., F. Fraschini, H. Jalkanen, E. E. Müller. Role of brain catecholamines in postcastration rise in plasma LH of prepubertal rats. *Endocrinology* 95:1249-1252, 1973
- 151.- Gnodde, H.P., G.A. Schuiling. Involvement of catecholaminergic and cholinergic mechanisms in the pulsatile release of LH in the long term ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 20:212-218, 1976
- 152.- Weick, R.F. Acute effect of adrenergic receptor blocking

- drugs and neuroleptic agents on pulsatile discharge of luteinizing hormone in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 26:108-114, 1978
- 153.- Gallo, R.B. & S.V. Drouva. Effect of intraventricular infusion of catecholamines on luteinizing hormone release in ovariectomized and ovariectomized steroid primed rats. *Neuroendocrinology* 29:149-156, 1979
- 154.- Gudelski, G.A., L. Annunziato, K.E. Moore. Increase in dopamine content of the rat median eminence after long term ovariectomy and its reversal by estrogen replacement. *Endocrinology*:101:1894-1899, 1977
- 155.- Donoso, A.O., M.B. De Gutierrez Mollano, R.S. Santolaya. Metabolism of noradrenaline in the hypothalamus of castrated rats. *Neuroendocrinology* 4:12-17, 1969
- 156.- Anton-Tay, F., R.W. Pelham, R.J. Wurtman. Increased turnover of ³H-norepinephrine in rat brain following castration or treatment with ovine follicle stimulating hormone. *Endocrinology* 84:1489-1494, 1969
- 157.- Kaizer, J.S., M. Palkovitz, J. Zivin, M. Brownstein, J.M. Saavedra, L.J. Kopin. The effect of endocrinological manipulation on tyrosinhydroxylase and dopamine beta-hydroxylase activities in individual hypothalamic nuclei of the adult male rat. *Endocrinology* 95:799-806, 1974

- 158.- DePaolo, L.B., S.M. McCann, A. Negro-Vilar. A sex difference in the activation of the hypothalamic catecholaminergic and luteinizing hormone releasing hormone peptidergic neurons after acute castration. *Endocrinology* 110:531-539, 1982
- 159.- Ranie, N., P.M. Wise, M.R. Selmanoff, C.A. Barraclough. Catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic areas and associated changes in median eminence luteinizing hormone releasing hormone and serum gonadotropins on proestrous and the estrous day one. *Endocrinology* 108:1795-1802, 1981
- 160.- Bapna, J.N., H. Neff, E. Acosta. A method for studying norepinephrine and serotonin metabolism in small regions of rat brain: effect of ovariectomy on amine metabolism in anterior and posterior hypothalamus. *Endocrinology* 89:1345-1349, 1971
- 161.- Kalra, S.P., S.M. McCann. Effects of drugs modifying catecholamine synthesis on plasma LH and ovulation in the rat. *Neuroendocrinology* 15:79-85, 1974
- 162.- Meyerson, B.J., C.H. Sawyer. Monoamines and ovulation in the rat. *Endocrinology* 83:170-178, 1968
- 163.- Gallo, R.B. Neuroendocrine regulation of pulsatile luteinizing hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 30:122-131, 1980

- 164.- Kalra, S.P., J.M. Simpkins, P.S. Kalra. Progesterone induced changes in hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone and catecholamines: differential effects of pentobarbital. *Endocrinology* 108:1299-1304, 1981
- 165.- Weiner, R.I. Role of catecholamines in the control of LH and prolactin secretion, In *Hypothalamic hormones*. Edited by M. Mottam, P.G. Crosignani, L. Martini. Academic Press. London. 1975, pp. 249-253.
- 166.- Honma, K., W. Wutke. Norepinephrine and dopamine turnover correlates in the medial preoptic area and the midbrain hypothalamus of rat brain after various endocrinological manipulations. *Endocrinology* 106:1848-1855, 1980
- 167.- Gallo, R.V., Luteinizing hormone secretion during continuous or pulsatile infusion of norepinephrine: central nervous system desensitization to constant norepinephrine input. *Neuroendocrinology* 35:380-387, 1982
- 168.- Advis, J.P., S.M. McCann, A. Negro-Vilar. Evidence that catecholaminergic and peptidergic neurons in suprachiasmatic medial preoptic, medial basal hypothalamus and median eminence are involved in estrogen negative feedback. *Endocrinology* 107:892-900, 1980
- 169.- Lofstrom, A., P. Eneroth, J.A. Gustafson, P. Skett. Effects of estradiol benzoate on catecholamine levels and turnover:

in discrete areas of median eminence and the limbic -
forebrain and on plasma LH, FSH, and PRL concentrations in
the ovariectomized female rat. *Endocrinology* 101:1559-1566
1977

170.- Knobil, E. On the control of gonadotropin secretion in the
rhesus monkey. *Rec. Prog. Hor. Res.* 30:1-49, 1974

171.- Estes, K.S., J.W. Simpkins, S.P. Kalra. Resumption with cloni-
dine of pulsatile Lh release following acute norepinephri-
ne depletion in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*
35:56-62, 1982

172.- Plant, T.M., Y. Nakai, P. Belchetz, E. Keogh, E. Knobil. The sites
of action of estradiol and phentolamine in the inhibition
of the pulsatile, circoral discharges of LH in the rhesus
monkey (*Macaca mulata*). *Endocrinology* 102:1015-1018, 1978

173.- Barraclough, C.A., C.H. Sawyer. Blockade of the release of
pituitary ovulating hormones in the rat by chlorpromazine
and reserpine: possible mechanisms of action. *Endocrinology*
61:341-348, 1957

174.- Bapna, J.N., H. Neff, E. Acosta. A method for studying norepi-
nephrine and serotonin metabolism in small regions of rat
brain: effect of ovariectomy on amine metabolism in anter-
ior and posterior hypothalamus. *Endocrinology* 89:1345-1349
1971

- 175.- Simpkins, J.W., P.S.Kalra, S.P.Kalra. Temporal alterations in luteinizing hormone releasing hormone concentrations in several discrete brain regions: effect of estrogen-progesterone and norepinephrine synthesis inhibition. *Endocrinology* 107:573-577, 1980
- 176.- Rance, N., P.M.Wise, C.A.Barraclough. Negative feedback effects of progesterone correlated with changes in hypothalamic norepinephrine and dopamine turnover rates, median eminence luteinizing hormone releasing hormone, and peripheral plasma gonadotropins. *Endocrinology* 108:2194-2199, 1981
- 177.- Leblanc, H., G.C.L.Lachelin, S.AbuFadil, S.S.C.Yen. Effects of dopamine infusion on pituitary hormone secretion in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 43:668-672, 1976
- 178.- Lachelin, G.C.L., S.AbuFadil, S.S.C.Yen. Functional delineation of hyperprolactinemic-amenorrhea. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 44:1163-1169, 1977
- 179.- Judd, S.J., J.S.Rakoff, S.S.C.Yen. Inhibition of gonadotropin and prolactin release by dopamine: effect of endogenous estradiol levels. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 47:494-499, 1978
- 180.- Martin, W.H., A.D.Rogol, D.L.Kaiser, M.O.Thorner. Dopaminergic mechanisms and luteinizing hormone (LH) secretion. II.

Differential effects of dopamine and bromocriptine on LH release in normal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52:650-656, 1981

181.- Vantall, E.V., J.L. Vaitukaris, G.T. Ross, J.W. Hickman, G. Ashwell. Effects of progressive desyhalization on the rates of disappearance of immunoreactive HCG from plasma in rats. *Endocrinology* 89:11-15, 1971

182.- Raymond, B., M. Beaulieu, F. Labrie. Potent antidopaminergic activities of estradiol at the pituitary level of prolactin release. *Science* 200:1173-1175, 1978

183.- Takahara, J.A., Arimura, A.V. Schally, Suppression of prolactin release by a purified porcine PIF preparation and catecholamines infused into a rat hypophyseal vessel. *Endocrinology* 95:462-465, 1974

184.- De Cotte, D.M., C.E.L. de Menezes. Dopamine stimulates the degradation of gonadotropin releasing hormone by rat synaptosomes. *Nature* 283:487-489, 1980

185.- Kalra, P.S., S.P. Kalra, L. Krulich, C.P. Fawcett, S.M. McCann. Involvement of norepinephrine in transmission of the stimulatory influence of progesterone on gonadotropin release. *Endocrinology* 90:1168-1176, 1972

186.- Gallo, R.V., R.B. Osland. Electric-stimulation of the arcuate nucleus in ovariectomized rat inhibits episodic lute

- nizing hormone(LH) release but excites LH release after estrogen priming. *Endocrinology* 99:659-668,1976
- 187.- Delitala, G.L., Devilla, N.R. Musso, . On the role of dopamine receptors in the naloxone-induced hormonal changes in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56:181-184, 1983
- 188.- Kono, S., G.R. Merram, D.D. Brandon, D.L. Loriaux, M.B. Lipsett. Radioimmunoassay and metabolism of the cathecolestrogen 2-hydroxyestradiol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54:150-157, 1982
- 189.- Gallo, R.V. Further studies on dopamine-induced suppression of pulsatile LH release in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 32:187-192, 1981
- 190.- Estes, K.S., J.W. Simpkins. Resumption of pulsatile luteinizing hormone release after alpha adrenergic stimulation in aging constant estrous rats. *Endocrinology* 111:1778-1784, 1982
- 191.- Naish, S.J., P. Ball. Cathecolestrogens and induction of sexual behavior in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 32:225-228, 1981
- 192.- Rodriguez-Sierra, J.F., C.A. Blake. Cathecolestrogens and the release of the anterior pituitary gland hormones. II. Prolactin. *Endocrinology* 110:325-329, 1982
- 193.- Foreman, M.M., J.C. Porter. Effects of catecolestrogens and

- catecholamines on hypothalamic and tyrosine hydroxylase activities. *JNeurochem.* 34:1175-1183,1980
- 194.- Roscoe, M.H., T.Lloyd, N.J. Maclusky, J. Weiz. The catecolestro~~gen~~ gen, 2-hydroxyestradiol 17 α , is formed from estradiol-17 α by hypothalamic tissues in vitro and inhibits tyrosine hydroxylase. *Endocrinology* 111:1734-1736, 1982
- 195.- Cecchini, D.J., C.Sati, A.S. Fanous, K. Shyamal, T.F. Brennan, E. C. Kenneth. Radioimmunoassay of 2-hydroxyestrone in plasma during the estrous cycle of the rat: interrelationships with estradiol, progesterone and the gonadotropins. *Endocrinology* 112:1122-1126, 1983
- 196.- Merriam, G.R., S.Kono, L. Loriaux, M.B. Lipsett, Does 2-hydroxyestrone suppress prolactin in women? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54:753-759, 1982
- 197.- Blank, M.S., D.L. Roberts. Antagonist of gonadotropin releasing hormone blocks naloxone induced elevations in serum luteinizing hormone. *Neuroendocrinology* 35:309-312, 1982.
- 198.- Ball, P., R. Knuppen, M. Haupt, H. Breuer. Interactions between estrogens and catecholamines. III. Studies on the methylation of catecolestrogens, catecholamines and other catechols by the catechol-o-methyltransferase of human liver. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34:736-740, 1972

- 199.- Lloyd, T., B.J. Ebersoule. Feedback inhibition of tyrosine hydroxylase from five regions of rat brain by 2-hydroxyestradiol and the hydroxyphenylalanine. *J. Neurochem.* 34:726-731, 1980
- 200.- Schaeffer, J., A.J.W. Hsueh. 2-hydroxyestradiol interaction with dopamine receptor binding in rat anterior pituitary. *J. Biol. Chem.* 254:5606-5612, 1979
- 201.- Rodriguez-Sierra, J.F., C.A. Blake. Catecolestrogens and release of anterior pituitary gland hormones. I. Luteinizing hormone. *Endocrinology* 110:318-324, 1982
- 202.- Merriam, G.R., N.J. MacLesky, L.A. Johnson, F. Naftolin. 17- α -2-hydroxyestradiol and 17- α -4-hydroxyestradiol catecolestrogens analogs with reduced estrogen receptor affinity. *Steroids* 36:13-18, 1980
- 203.- Naftolin, F., H. Mirishita, I.J. Davis, R. Todd, K.J. Ryan, J. Fishman. Two hydroxyestrone induced rise in serum LH in the immature male rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65:905-912, 1975
- 204.- Rodriguez-Sierra, J.F., C.A. Blake. Lack of stimulation of phasic LH release by catecolestrogens in the rat. *Life Sci.* 26:743-748, 1980
- 205.- Fishman, J., D. Tulchinsky. Suppression of prolactin secretion in normal young women by 2-hydroxyestrone. *Science*

216:73-74,1980

- 206.- Parvizi, N., F. Elendorff. 17-beta-2-hydroxyestradiol as a possible link in steroid brain interaction. *Nature* 256: 59-61, 1975
- 207.- Reid, R.L., J.D. Hoff, S.S.C. Yen, C.H. Li. Effects of exogenous beta-endorphin on pituitary hormone secretion and its disappearance rate in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52:1179-1182, 1981
- 208.- Krieger, D.T., A.S. Liotta, M.J. Brownstein, E.A. Zimmerman. - ACTH-beta-lipotropin, and related peptides in brain, pituitary and blood. *Recent Prog. Horm. Res.* 36:277-284, 1980
- 209.- Goldstein, A. Opioid peptides (endorphins) in pituitary and brain. *Science* 193:1081-1086, 1976
- 210.- Snyder, S. Opiates receptors in normal and drug altered - brain function. *Nature* 257:185-189, 1975
- 211.- Hughes, J., T.W. Smith, H.W. Kosterlitz, A.L. Fothergill, B.A. Morgan, H.E.R. Morris. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258:577-579, 1975
- 212.- Snyder, S.H. Brain peptides as neurotransmitters. *Science* 209:976-983, 1980
- 213.- Sarkar, D.K., G. Fink. Gonadotropin releasing hormone surge: possible modulation through postsynaptic alpha-adrenoreceptor

tors and two pharmacologically distinct dopamine receptors
Endocrinology 108:862-867,1981

214.- Sing,H.H.,B.Purohit,B.S.Ahluwalia. Methadone blocks dopamine-mediated release of gonadotropins in rat hypothalamus. Neuroendocrinology 34:347-352,1982

215.- Wardlaw,S.L.,W.B.Wehrenberg,M.Ferin,A.G.Frantz. Failure of beta endorphin to stimulate prolactin release in the pituitary stalk-sectioned monkey. Endocrinology 107:1663-1669,1980

216.- Wehrenberg,W.B.,D.McNicol,S.L.Wardlaw,A.G.Frantz,M.Ferin. Dopaminergic and serotonergic involvement in opiate-induced prolactin release in monkeys. Endocrinology 109:544-550,1981

217.- Pollard,H.,G.Llorens-Cortes,J.C.Schwartz, Enkephalin receptors on dopaminergic neurons in rat striatum. Nature 268:745-748,1977

218.- Gudelsky,G.A.,J.C.Porter. Morphine and opioid peptide-induced inhibition of the release of dopamine from tuberoinfundibular neurons. Life Sci. 25:1697-1701,1979

219.- Drouva,S.V.,J.Epelbaum,L.Tapia-Arancibia,E.Laplante,C.Kordon. Opiate receptors modulate LH-RH and SRIF release from mediobasal hypothalamic neurons. Neuroendocrinology 32:163-167,1981

- 220.- Quigley, M.E., S.S.C.Yen. The role of the endogenous opiates on LH secretion during the menstrual cycle. *J.Clin. Endocrinol.Metab.* 51:179-183, 1980
- 221.- Ropert, J.C., M.E.Quigley, S.S.CYen. Endogenous opiates modulate pulsatile luteinizing hormone release in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 52:583-588, 1981
- 222.- Ropert, J.F., M.E.Quigley, S.S.C.Yen. Endogenous opiates modulate pulsatile luteinizing hormone release in humans. *J.Clin. Endocrinol.Metab.* 52:583-585, 1981
- 223.- Ferin, M., W.B.Wehrenberg, N.Y.Lam, E.J.Alston, R.L.VandeWiel. Effects and site of action of morphine on gonadotropin secretion in the female rhesus monkey. *Endocrinology* 111:1652-1656, 1982
- 224.- Virbicky, K.W., J.S.Baumstark, I.C.Wells, T.H.W.Hilgers, W.T.Kable, C.J.Elias. Evidence of the involvement of beta endorphine in the human menstrual cycle. *Fertil.Steril.* 38:701-704, 1982
- 225.- Kalra, S.P., W.R.Crowly. Epinephrine synthesis inhibitors block naloxone-induced LH release. *Endocrinology* 111:1403-1405, 1982
- 226.- Everet, J.W., L.Tyri. Similarity of luteinizing hormone surges induced by medial preoptic stimulation in female rats blocked with pentobarbital, morphine, clorpromazine

or atropine. *Endocrinology* 111:1979-1985, 1982

- 227.- Quigley, M. E., K. L. Shiha, R. F. Casper, S. S. C. Yen. Evidence for increased dopaminergic and opioid activity in patients with hypothalamic hypogonadotropic amenorrhea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50:949-953, 1980
- 228.- Sperof, L. Getting high on running. *Fertil. Steril.* 36:149-153, 1981
- 229.- Advis, J. P., J. E. Kranse, J. F. McKelvy. LH-RH peptidase activities in discrete hypothalamic regions and anterior, pituitary of the rat: apparent regulation during the prepubertal period and first estrous cycle at puberty. *Endocrinology* 110:1238-1245, 1982
- 230.- Vale, W., C. Rivier, M. Brown. Regulatory peptides of the hypothalamus. *Ann. Rev. Physiol.* 39:473-527, 1977
- 231.- McKelvy, J. F., J. L. Charli, P. J. Bravo, T. Sherman, C. Loudes. Cellular biochemistry of brain peptides: biosynthesis, degradation, packaging, transport and release. In *Endocrine - functions of the brain*. Edited por M. Motta. Raven Press N.Y. 1980. pp. 171-193
- 232.- Schally, A. V., Y. Baba, T. W. Redding, H. Matsuo, A. Arimura. Further studies of the enzymatic and chemical inactivation of hypothalamic FSH-RH. *Neuroendocrinology* 8:347-358, 1971

- 233.- Laudes, C., P.J. Bravo, P. Leblanc, C. Kordon. Specific activity of LH-RH and TRH degrading enzymes in various tissues of normal and castrated male rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83:921-926, 1978
- 234.- Griffiths, E.C., K.C. Hooper, C.R.N. Hopkinson. Evidence for an enzymic component in the rat hypothalamus capable of inactivating luteinizing hormone releasing factor (LRF). *Acta Endocrinol.* 74:49-55, 1973
- 235.- Koch, Y., T. Baram, P. Chobsieng. Enzymic degradation of luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) by hypothalamic tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61:95-103, 1974
- 236.- Marks, N., F. Stern. Enzymatic mechanisms for inactivation of LH-RH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61:1453-1463, 1974
- 237.- Kuhl, H., H.D. Taubert. Inactivation of luteinizing hormone releasing hormone by rat hypothalamic L-cystine arylamidase. *Acta Endocrinol.* 78:634-648, 1975
- 238.- Herch, L.V., J.F. McKelvy. Enzymes involved in the degradation of thyrotropin releasing hormone (TRH) and luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in bovine brain. *Brain. Res.* 168:553-564, 1979
- 239.- Kochman, K., B. Kerdelhue, U. Zor, M. Jutisz. Studies of enzymatic degradation of luteinizing hormone releasing hormone by different tissues. *Febs. Letters* 50:190-194, 1975

- 240.- Hazum, E., M. Fridkin, T. Baram, J. Koch. Degradation of gonadotropin releasing hormone by anterior pituitary enzymes. Febs. Letters 127:272-276, 1981
- 241.- Parker, C.R., M.M. Foreman, J.C. Porter. Subcellular localization of luteinizing hormone releasing hormone degrading activity in the hypothalamus. Brain. Res. 174:221-233, 1979
- 242.- Acaopyan, T.N., A.A. Arutunyan, A.I. Oganisyan, A. Lajtha, A.A. Galoyan. Breakdown of hypothalamic peptides by hypothalamic neural endopeptidase. J. Neurochem. 32:629-631, 1979
- 243.- Advis, J.P., J.E. Krause, J.P. McKelvy. LH-RH peptidase activities in the female rat: characterization by an assay based on high performance liquid chromatography. Analit. Biochem. 125:41-49, 1982
- 244.- Advis, J.P., J.E. Krause, J.F. McKelvy. Evidence that endopeptidase catalyzes luteinizing hormone releasing hormone cleavage contributes to the regulation of median eminence LH-RH levels during positive steroid feedback. Endocrinology 112:1147-1149, 1983
- 245.- Krause, J.E., J.P. Advis, J.F. McKelvy. Characterization of the site of cleavage of luteinizing hormone releasing hormone under conditions of measurements in which LH-RH degradation undergoes physiologically related change. Bio -

chem.Biophys.Res.Comm. 108:1475-1481,1982

- 246.- Koch, Y., T. Baram, E. Hazum, M. Fridkin. Resistance to enzymic degradation of LH-RH analogs possessing increased biological activity. Biochem.Biophys.Res.Comm. 74:488-491,1977
- 247.- McKelvy, J.F., P. Leblanc, C. Laudes, S. Perry, Y.G. Jorgensen, C. Kordon. The use of bacitracin as an inhibitor of the degradation of thyrotropin releasing factor and luteinizing hormone releasing factor. Biochem.Biophys.Res.Comm. 73:507-515,1976
- 248.- Griffiths, E.C., K.C. Hooper. Changes in hypothalamic peptidase activity during the oestrous cycle in the adult female rat. Acta Endocrinol. 74:41-48, 1973
- 249.- Kuhl, H., C. Rosniatowski, M. Blicke, H.D. Taubert. Stimulation by steroids and H-dependent changes of L-cystine arylamidase activity in the hypothalamus of the rat. Acta Endocrinol. 76:15-23,1974
- 250.- Kuhl, H., C. Rosniatowski, A. Oen, H.D. Taubert. Sex steroids stimulates the activity of hypothalamic arylamidase in the rat. Acta Endocrinol. 76:1-14,1974
- 251.- Kuhl, H., H.D. Taubert. Short loop feedback mechanisms of luteinizing hormone: LH stimulates hypothalamic L-cystine arylamidase to inactivate LH-RH in the rat hypothalamus.

Acta Endocrinol. 78:649-663,1975

- 252.- Simpkins, J.W., P.S.Kalra, S.P.Kalra. Temporal alterations in luteinizing hormone releasing hormone concentrations in several discrete brain regions: effects of estrogen, progesterone and norepinephrine synthesis inhibition. *Endocrinology* 107:573-578, 1980
- 253.- Advis, J.P., J.Simpkins, W.Chen, J.Meites. Relation of biogenic amines to the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 103:11-19, 1978
- 254.- Griffiths, E.C., K.C.Hooper. Peptidase activity in different areas of the rat hypothalamus. *Acta Endocrinol.* 77:10;18, 1974
- 255.- Johanson, K.N.G. Biosynthesis in vitro of the luteinizing hormone releasing hormone by hypothalamic tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53:502-507, 1972
- 256.- Curtis, A., G.Fink. A high molecular weight precursor of luteinizing hormone releasing hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology* 112:390-392, 1983
- 257.- Burrows, H., A.Barnea. Copper stimulates the release of luteinizing hormone releasing hormone from isolated hypothalamic granules. *Endocrinology* 110:1456-1458, 1982
- 258.- Frederickson, R.C.A. Peptide receptors in the brain. In *The endocrine functions of the brain*. Edited por M.Notta

N.Y. Raven Press. 1980. pp.

- 259.- Hebert, D., W.D. Odell. Pituitary receptor binding activity of active, inactive, superactive and inhibitory analogs of gonadotropin-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82:67-73, 1978
- 260.- Pedroza, E., J.A. Vilchez-Martinez, J. Fishback, A. Arimura, A.V. Schally. Binding capacity of luteinizing hormone-releasing hormone and its analogues for pituitary receptors sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79:234-238, 1977
- 261.- Loumaye, E., Z. Naor, K.J. Catt. Binding affinity and biological activity of gonadotropin releasing hormone agonists in isolated pituitary cells. *Endocrinology* 111:730-736, 1982
- 262.- Hazum, E., D. Keinan. Gonadotropin releasing hormone receptors: Photoaffinity labeling with an antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110:116-123, 1983
- 263.- Clayton, R.N., R.A. Shakespear, J.A. Duncan, J.C. Marshall, P. J. Munson, D. Rodbard. Radioiodinated nondegradable gonadotropin releasing hormone analogs: new probes for the investigation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* 105:1369-1381, 1979
- 264.- Naor, Z., R.N. Clayton, K.J. Catt. Characterization of gonadotropin-releasing hormone receptors in culture rat pi-

tuitary cells. *Endocrinology* 107:1144-1152,1980

265.- Savoy-Moore, R.T., N.B. Schwarts. Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during the rat estrous cycle. *Science* 209:942-944,1980

266.- Marian, J.P., M. Conn. Subcellular localization of the receptor for gonadotropin-releasing hormone in pituitary and ovarian tissue. *Endocrinology* 112:104-112,1983

267.- Conn, P.M., E. Hazum. Luteinizing hormone release and gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) receptor internalization: independent actions of GnRH. *Endocrinology* 109:2040-2045,1981

268.- Conn, P.M., R.G. Smith, D.C. Rogers. Stimulation of pituitary gonadotropin release does not require internalization of gonadotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.* 256:1098-1102,1981

269.- Pieper, D.R., R.R. Gala, S.R. Regiani, J.C. Marshall. Dependence of pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors on GnRH secretion from the hypothalamus. *Endocrinology* 110:749-753,1982

270.- Clayton, R.N., K.J. Catt. Regulation of pituitary gonadotropin releasing hormone receptors by gonadal hormone. *Endocrinology* 108:887-895,1981

271.- Clayton, R.N., A.R. Solano, A. García-Vela, A.L. Dufau,

K.J.Catt. Regulation of pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone during rat estrous cycle. Endocrinology 107:699:705,1980

272.- Gonne,B.S.,S.Scaglioni,U.Lang,P.C.Sizonenko,M.L.Aubert. Pituitary receptor sites for gonadotropin-releasing hormone effect of castration and substitutive therapy with sex steroids in the male rat. Endocrinology 110:70-79, 1982

273.- Sarkar,D.K.,G.Fink. Effect of gonadal steroids on output of LH-RF into pituitary stalk blood from female rats.J. Endocrinol. 80:303-310,1979

274.- Ben-Jonathen,N.,R.S.Mical,J.C.Porter. Superfusion of hemipituitary with portal blood.I. LRF secretion in castrated and diestrous rats. Endocrinology 93:497-503,1973

275.- Clayton,R.N.,R.M.Popkin,H.M.Fraser. Hypothalamic regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors:effects of gonadotropin releasing hormone immunoneutralization. Endocrinology 110:1116-1123,1982

276.- Bremner,W.J.,J.F.Findlay,V.W.K.Lee,D.M. de Kretser,I.A. Cumming. Feedback effects of the testis on pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone infusions in the ram. Endocrinology 106: 329-336, 1980

277.- Smith,W.A.,P.M.Conn. GnRH-mediated desensitization of

the pituitary gonadotrope is not calcium dependent.

Endocrinology 112:408-410,1983

278.- Aiyer, M.S., G. Fink. Changes in the sensitivity of the pituitary gland to LH-RF during the oestrous cycle in the rat. J. Endocrinol. 60:47-55, 1974

279.- Gordon, J.H., S. Reichlin. Changes in the pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing factor during the rat estrous cycle. Endocrinology 91:974-980, 1974

280.- Ferin, M., M. Waren, I. Dyrenfurth, R.L. Vande-Wiele, W.F. White. Response of rhesus monkeys to LRF throughout the ovarian cycle. J. Clin. Endocrinol. Metab. 38:231-237, 1974

281.- Dufau, M.L., I.Z. Beitins, J.W. McArthur, K.J. Catt. Effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) upon bioactive and immunoreactive serum levels in normal subjects. J. Clin. Endocrinol. Metab. 43:658-664, 1976

282.- Clayton, R.N., A.R. Solano, A. Garcia-Vela, A.L. Dufau, K.J. Catt. Regulation of pituitary receptors for gonadotropin releasing hormone during the rat estrous cycle. Endocrinology 107:699-706, 1980

283.- Adams, T.E., R.L. Norman, H.G. Spies. Gonadotropin-releasing hormone receptor binding and pituitary responsiveness in estradiol-primed monkeys. Science 213:1388-1390, 1981

284.- Loumaye, E., K.J. Catt. Homologous regulation of gonadotro-

- pin releasing hormone receptors in culture pituitary cells. *Science* 215:983-985,1982
- 285.- Barkan, A.L., S.R.Regiani, J.A.Duncan, J.C.Marshall. Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during gonadotropin surges in ovariectomized estradiol treated rats. *Endocrinology* 112:1042-1048,1983
- 286.- Heber, D., R.Dodson, R.S.Swardloff. Pituitary receptor site blockade by a gonadotropin-releasing hormone antagonist in vivo:mechanism of action. *Science* 216:420-421,1982
- 287.- Sen, K.K., S.Azhar, K.M.J.Menon. Evidence for the involvement of an energy dependent process in gonadotropin-releasing hormone stimulated luteinizing hormone release by rat anterior pituitary. *Endocrinology* 105:1158-1161,1979
- 288.- Labrie, F., P.Borgeat, L.Ferland, A.Lemay, A.Dupont, S.Lemaire, G.Pelletier, N.Barden, J.Drouin, A.Léan, A.Bélangier, P.Jolicoeur. Mechanism of action and modulation of activity of hypothalamic hypophysiotropic hormones. In *Hypothalamic hormones*. Edited por M.Motta, P.G.Crosignani, L.Martini. Academic.Press.London.1975, pp. 109-123
- 289.- Snyder, G.Z.Naor, C.P.Fawcett, S.M.McCann. Gonadotropin release and cyclic nucleotides:evidence for luteinizing hormone-releasing hormone induced elevation of guanosine-3',5'-monophosphate leads in gonadotrophs. *Endocrinology*

107:1627-1633,1980

- 290.- Borgueat, P., G. Chavancy, A. Dupont, A. Labrie, A. Arimura, A. V. Schally. Stimulation of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate accumulation in anterior pituitary gland in vitro by synthetic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH/FSH RH). Proc Natl. Acad. Sci. USA. 69:2677-2681, 1972
- 291.- Borgeat, P., F. Labrie, J. Côté, F. Ruel, A. V. Schally, D. H. Coy, E. J. Coy, N. Yanaihara. Parallel stimulation of cyclic AMP accumulation and LH and FSH release by analogs of LHRH - in vitro. Mol. Cell. Endocrinol. 1:7-20, 1974
- 292.- Kaneko, T. S., H. Saito, T. Oka, T. Oda, N. Yanaihara. Effects of synthetic LHRH and its analogs on anterior rat cyclic AMP and LH and FSH release. Metabolism 22:77-78, 1973
- 293.- Makino, T. Study of the intracellular mechanism of LH release in the anterior pituitary. AM. J. Obstet. Gynecol. - 115:606-614, 1973
- 294.- Naor, F., Y. Koch, P. Chobsiang, U. Zor. Pituitary cyclic AMP Production and Mechanism of luteinizing hormone release. Febs. Letter. 58:318-321, 1975
- 295.- Naor, F., Y. Koch, S. Bauminger, U. Zor. Action of luteinizing hormone and synthesis of prostaglandins in the pituitary gland. Prostaglandins. 9:211-219, 1975
- 296.- Naor, Z., A. M. Leifer, K. J. Catt. Calcium-dependent actions

of gonadotropin-releasing hormone an pituitary guanosine 3'-5'-monosphate production and gonadotropin release. Endocrinology 107:1438-1445,1980

- 297.- Drouva, S.V., J. Epelbaum, M. Hery, L. Tapia, E. Laplante, C. Kordon. Ionic channels involved in the LH-RH and SRIF release from rat mediobasal hypothalamus. Neuroendocrinology 32:155-162,1981
- 298.- Conn, M.P., D.C. Rogers. Gonadotropin release from pituitary cultures following activation of endogenous ion channels. Endocrinology 107: 2133-2134,1980
- 299.- Wei, Liu Kao, G.L. Gunsalus, G.H. Williams, J. Weiz. Response of the perfused anterior pituitaries of rats to synthetic gonadotropin-releasing hormone: a comparison with hypothalamic extract and demonstration of a role of potassium in release of luteinizing hormone and follicle stimulating hormones. Endocrinology 101:1444-1454,1977
- 300.- Harwood, J.P., R.N. Clayton, K.J. Catt. Ovarian gonadotropin releasing hormone receptors. I. Properties and inhibition of luteal cell function. Endocrinology 107:407-413,1980
- 301.- Harwood, J.P., R.N. Clayton, T.T. Chen, G. Kno, K.J. Catt. Ovarian gonadotropin-releasing hormone receptors. II. Regulation and effects on ovarian development. Endocrinology 107:414-421,1980

- 302.- Pieper, D.R., J.S. Richards, J.C. Marshall. Ovarian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors: characterization, distribution, and induction by GnRH. *Endocrinology* 108: 1148-1155, 1981.
- 303.- Rajaniemi, H., T. Vanha-Perttula. Specific receptor for LH in the ovary: evidence by autoradiography and tissue fractionation. *Endocrinology* 90:1-9, 1972.
- 304.- Lecompte, P., N.G. Wang, K. Sundaram, J. Rivier, W. Vale, C.W. Bardin. The antiandrogenic action of gonadotropin-releasing hormone and its agonists on the mouse kidney. *Endocrinology* 110:1-6, 1982.
- 305.- Ranta, T., A. Baukaf, M. Knecht, M. Morhonen, K.J. Catt. Inhibitory actions of a gonadotropin-releasing hormone agonist on ovarian follicle-stimulating hormone receptors and adenylate cyclase in vivo. *Endocrinology* 112:956-964, 1983.
- 306.- Clayton, R.N., J.P. Harwood, K.J. Catt. Gonadotropin releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature* 282:90-92, 1979.
- 307.- Rivier, C., J. Rivier, W. Vale. Chronic effects of (D-Trp⁶-Pro⁹-Net) luteinizing hormone releasing factor on reproductive processes in the female rat. *Endocrinology* 103: 2299-2305, 1978.
- 308.- Sheeman, K.L., R.F. Casper, S.S.C. Yen. Effects of a superac

tive luteinizing hormone-releasing hormone agonist on gonadotropin and ovarian function during the menstrual cycle. *AM.J.Obstet.Gynecol.* 135:759-763,1979

309.- Casper, R.F., S.S.C.Yen. Menopausal flushes: effect of pituitary gonadotropin desensitization by a potent luteinizing hormone releasing factor agonist. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 53:1056-1058,1981

310.- Heber, D., R.S.Swedloff. Down-regulation of pituitary gonadotropin secretion in postmenopausal females by continuous gonadotropin-releasing hormone administration. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 52: 171-172,1981

311.- Bourne, G.Y., M.R.Dockrill, S.Regiani, J.G.Marshall, A.H.Payne. Induction of testicular gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors by GnRH: effects of pituitary hormones and relationship to inhibition of testosterone production *Endocrinology* 110:727-732,1982

312.- Lemay, A., F.Labrie, L.Ferland, J.P.Raynand. Possible luteolytic effects of LHRH in normal women. *Fertil.Steril.* 31: 29-34,1979

313.- Hsue, S.J.W., C.Wang, G.P.Erickson. Direct inhibitory effect of gonadotropin-releasing hormone upon follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptor and aromatase cells. *Endocrinology* 106:1697-1705,1980

- 314.- Knecht, M., A. Amsterdam, K. J. Catt. Inhibition of granulosa cells differentiation by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 110:865-872, 1982
- 315.- Ying, S. Y., R. Guillemin. (D-Trp⁶-Pro⁹-NH₂)-luteinizing hormone releasing factor inhibits follicular development in hypophisectomised rats. *Natura*: 280:593-595, 1979
- 316.- Kledzik, G. S., L. Cusan, C. Auclair, R. A. Kelly, F. Labrie. Inhibition of ovarian luteinizing hormone and follicle stimulating hormone receptors with and LH-releasing hormone agonist during estrous cycle in the rat. *Fertil. Steril.* 30: 348-353, 1978
- 317.- Jones, P. B. C., A. J. W. Hsueh. Direct inhibitory effect of gonadotropin-releasing hormone upon luteal luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 107:1930-1936, 1980
- 318.- Reddy, P. V., S. Azhar, R. M. J. Menon. Multiple inhibitory actions of luteinizing hormone-releasing hormone agonist on luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-receptor mediated ovarian responses. *Endocrinology* 107:930-936, 1980
- 319.- Dufau, M. I., S. Cigorra, A. J. Bauka, S. Sorrel, J. M. Bator, J. P. Neubauer, K. J. Catt. Androgen biosynthesis in Leydig cells after testicular desensitization by luteinizing hormone-

- releasing hormone and human chorionic gonadotropin. Endocrinology 105:1314-1321, 1979
- 320.- Clark, M.R., C. Thibier, J.M. Marsh, W.J. Lemaire. Stimulation of prostaglandin accumulation by luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) and LH-RH analogs in rat granulosa cells in vitro. Endocrinology 107:17-23, 1980
- 321.- Sharpe, R.M., H.M. Fraser. HCG stimulation of testicular LH-RH like activity. Nature 287:642-643, 1979
- 322.- Hsueh, A.J.W., G.F. Erickson. Extra pituitary inhibition of testicular function by LHRH. Nature 281:66-67, 1979
- 323.- Bambino, T.H., J.R. Schreiber, A.J.W. Hsueh. Gonadotropin-releasing hormone and its agonist inhibit testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in immature and adult rats. Endocrinology 107:908-916, 1980
- 324.- Cigorra, S., M.L. Dufau, K.J. Catt. Regulation of luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in gonadotropin-desensitized leydig cells. J. Biol. Chem. 253:4297-4300, 1978
- 325.- Cooper, R.F., G.F. Erickson, R.W. Rebar, S.S.C. Yen. The effect of luteinizing hormone releasing factor and its agonist on culture human granulosa cells. Fertil. Steril 37:406-409, 1982
- 326.- Clayton, R.N., I.T. Huhtaniemi. Absence of gonadotropin-releasing hormone receptors in human gonadal tissue. Nature

299:56-59,1982

- 327.- Wang, C. Luteinizing hormone-releasing hormone stimulates plasminogen activator production by rat granulosa cells. *Endocrinology* 112:1130-1132, 1983
- 328.- Ekholm, C., M.R. Clark, C. Magnasson, O. Isaksson, W.J. Lemaire. Ovulation induced by a gonadotropin releasing hormone analog in hypophysectomized rats involves prostaglandins. *Endocrinology* 110:288-290, 1982
- 329.- Behrman, H.R., A.K. Hall, S.L. Preston, S.D. Gore. Antagonistic interactions of adenosine and prostaglandin F₂ alpha modulate acute responses of luteal cells to luteinizing hormone. *Endocrinology* 110:38-46, 1982
- 330.- Sotrel, G., A. Helvacioğlu, S. Dowers, A. Scommegnam, F.J. Auletta. Mechanisms of luteolysis: effect of estradiol and prostaglandin F₂ alpha on corpus luteum luteinizing hormone / human chorionic gonadotropin receptors and cyclic nucleotides in the rhesus monkey. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 139:134-140, 1981
- 331.- Hillensio, T., W.J. Lemaire. Gonadotropin-releasing hormone agonists stimulates meiotic maturation of follicle-enclosed rat oocytes in vitro. *Nature* 287:145-147, 1980
- 332.- Leung, P.C.K., V. Raymond, F. Labrie. Stimulation of phosphatidic acid phosphatidylinositol labeling in luteal cells

by luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* **112**

112:1138-1140, 1983

CAPITULO 5.

APLICACIONES CLINICAS DE LA GnRH Y SUS ANALOGOS.

Durante mucho tiempo se ha buscado sustituir el empleo de anovulatorios esteroidales debido a que éstos, además de inhibir la liberación de GnRH hipotalámica, tienen múltiples efectos secundarios, claramente atribuibles a las diversas funciones que poseen (1-6).

Con el aislamiento y la síntesis de la GnRH en 1971 (7,8), se dió lugar, como fue mencionado previamente, a la búsqueda de numerosos péptidos sintéticos de mayor actividad que la secuencia natural, ya que este péptido representa el candidato "ideal" para la sustitución de dichos anticonceptivos.

Desde ese momento se han sintetizado más de 1000 derivados de la GnRH (7-13). Por lo tanto la disponibilidad de numerosos péptidos sintéticos de potente actividad ha hecho posible la evaluación detallada de la actividad farmacológica de éstos sobre la reproducción animal (7-10). Originalmente se pensó, que la inducción de los ciclos anovulatorios por la falta de la liberación de gonadotrofinas, podía ser lograda por medio de análogos antagonistas a la GnRH. También se pensó que para poder inducir la ovulación en animales infértiles se requeriría de la administración de análogos agonistas, ofreciendo una terapia eficiente para el tratamiento de la infer-

tilidad tanto femenina como masculina. Sin embargo, se han presentado ciertas dificultades para lograr tales cometidos debido a los "efectos paradójicos" provocados por estos neuropeptidos en los animales experimentales y en los humanos de ambos sexos (14-30,31,32).

Es notorio, que en ambos sexos, exista aparentemente un modo de acción anticonceptivo común de la GnRH y sus análogos agonistas, expresados vía el eje hipofisiario-gonadal. En muchas investigaciones utilizando dosis y programas de administración variados, se ha demostrado que estos péptidos, por virtud de sus propiedades agonistas tradicionales, generan una serie de eventos hormonales que eventualmente resultan en la incompetencia reproductiva. Así tenemos que estos peptidos producen:

1. En la mujer.

1.1. Incrementos exagerados en la concentración de LH del suero al principio del tratamiento

1.2. Patrones distorsionados de la secreción de FSH

1.3. Secreción inapropiada de PRL

1.4. Desensibilización ovárica de receptores para LH, FSH y PRL

evidenciados por la observación de:

1.4.1. luteólisis prematura

1.4.2. esteroidogénesis deficiente

1.4.3. secreción retardada de estrógenos

1.4.4. disminución en la secreción de progesterona

1.4.5. inhibición y/o terminación del embarazo (7,8,19,21,33, 34,35).

2. En el hombre.

2.1. Inhibición de la actividad androgénica sobre el tracto reproductivo masculino. Esto trae como consecuencia:

2.1.1. reducción del peso testicular

2.1.2. reducción del peso de las glándulas accesorias

2.2. Desensibilización de los gonadotrofos a la GnRH

2.3. Disminución en los niveles de receptores testiculares para la GnRH

2.4. Inhibición de la esteroidogénesis testicular

2.5. Reducción en la espermatogénesis (35,36).

A pesar de que el mecanismo preciso, responsable de estos efectos paradójicos no se conoce perfectamente, se cree que parte de éstos, están mediados probablemente por la pérdida de receptores gonadales e hipofisarios a la LH y GnRH respectivamente, causadas como consecuencia de la liberación excesiva de gonadotrofinas (ver capítulo 4) (24-26, 35, 37-39).

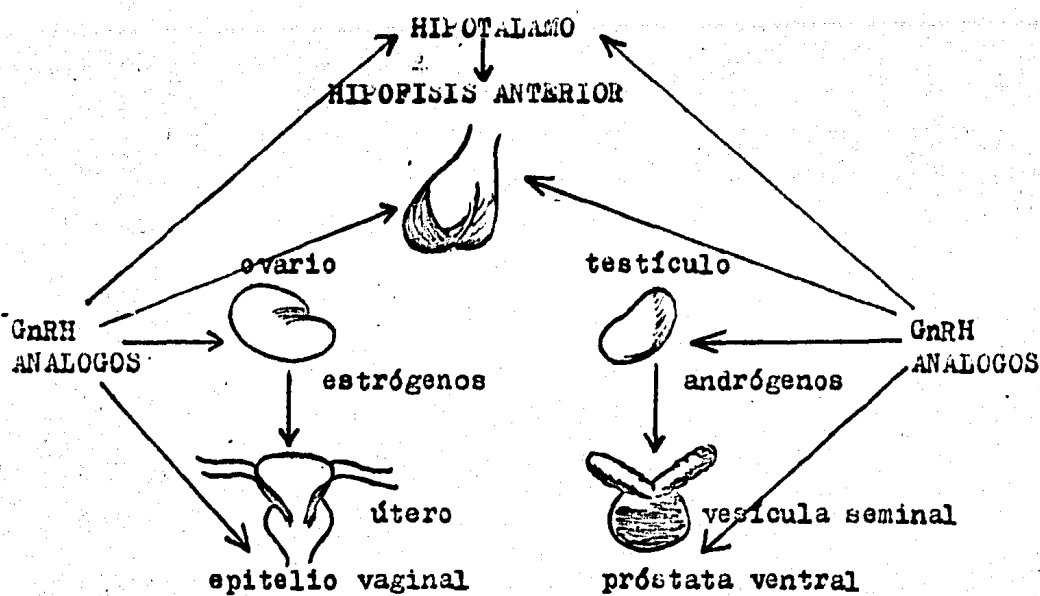


Figura 5.1

5.1 ANALOGOS AGONISTAS DE LA GnRH COMO AGENTES ANTICONCEPTIVOS UTILIZADOS EN HEMBRAS.

Los últimos 15 años, han presentado avances dramáticos en la química y la farmacología de la GnRH y sus análogos (40). Estos, han sido evaluados en su uso potencial como agentes anticonceptivos, basados en su habilidad para inhibir la secreción de gonadotropinas y consecuentemente, la ovulación, o bien para producir "efectos paradójicos" de antifertilidad en hembras preñadas y no preñadas (7,29,41,42).

El área de investigación que ha obtenido los resultados más prometedores es el que se relaciona con los agonistas, pues a diferencia de los antagonistas, desde un principio se lograron sintetizar análogos agonistas muy potentes.

Cuando se observó que estos superanálogos (agonistas) además de poseer las propiedades básicas de la GnRH natural (estimular la liberación de gonadotropinas e inducir la ovulación) podían alterar profundamente el eje hipófisis-gónadas, produciendo de esta manera efectos anticonceptivos, fue entonces que la atención se enfocó hacia los superagonistas, dejando a un lado a los antagonistas.

5.1.1 EFECTOS PROOVULATORIOS.

5.1.1.1 INHIBICION DE LA OVULACION.

El mecanismo que controla el desarrollo folicular, la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y la luteólisis en las mujeres, no está completamente entendido.

La formación del cuerpo lúteo es una secuela iniciada por la secreción de LH (43-45). La función normal del cuerpo lúteo es dependiente de la estimulación continua efectuada por la LH, pero también lo es, de un desarrollo folicular apropiado.

El desarrollo folicular en las mujeres, depende de una relación de FSH/LH adecuada.

Los niveles crecientes de FSH durante la fase luteal tardía, proveen del apoyo esteroidal y gonadotrófico requerido para el crecimiento de los folículos preantrales, uno de los

cuales ovulará en el siguiente ciclo. Si hay problemas prematuros en la secreción de FSH y de LH durante el ciclo menstrual, se afecta el crecimiento del folículo, dando como resultado la anovulación o bien una función insuficiente del cuerpo lúteo.

El aumento inicial, y la caída posterior de los niveles de estrógenos en la fase preovulatoria, también es un requisito para el surgimiento ovulatorio de LH en la mitad del ciclo (43,46-48).

Por otro lado, la LH, induce la ovulación sólo si el desarrollo folicular se completa, señal proporcionada por los altos niveles de estrógenos.

La administración de la GnRH antes de que el folículo esté totalmente desarrollado, no da como resultado la ovulación ni una función normal del cuerpo lúteo, pues la presencia de niveles altos de LH antes de que el desarrollo folicular sea concluido, disminuíra considerablemente los receptores para la LH presentes en las células de la granulosa, induciendo así el desarrollo de un cuerpo lúteo deficiente.

Estas observaciones, sugieren que la GnRH, puede ser utilizada para bloquear la ovulación o bien para formar un cuerpo lúteo deficiente, siempre y cuando su administración se haga durante la fase folicular o preovulatoria (43,49,50).

En estudios realizados con animales experimentales se ha demostrado la capacidad de la GnRH para producir infertilidad cuando es administrada crónicamente. En mujeres, la administración crónica de los análogos potentes de la GnRH inhibe la ovulación.

Los primeros estudios realizados en mujeres han ofrecido resultados parecidos a los obtenidos en primates. Así, con dosis diarias de 5 microgramos de (D-Ser(TBU)⁶)LHRH etilamida (comercialmente llamada Buserelina), administradas subcutáneamente a partir del día de la menstruación, evitaron la ovulación en 4 mujeres (51). Observaciones similares se obtuvieron de la administración de 100 microgramos/día de GnRH y 2.5 microgramos/día de D-Trp⁶-LHRH etilamida. La administración nasal de buserelina a una dosis de 400 microgramos/día inhibe consistentemente la ovulación, como lo demuestran los estudios hechos con 26 mujeres que no utilizaron otro anticonceptivo y no hubo embarazo (51).

En otro estudio realizado con 51 mujeres en las que la administración de buserelina se prolongó por un período mayor de un año, se observaron resultados similares sin efectos adversos de importancia. Además el patrón de sangrado fue muy irregular correlacionándose adecuadamente con el cuadro histológico endometrial de baja proliferación (52,53).

Es importante hacer notar que el efecto es reversible, pues la ovulación normal se reanuda en 4 semanas después de discontinuar el tratamiento(51).

En la actualidad, la administración intranasal, es la más utilizada y se ha observado que aparentemente es bien tolerada por las voluntarias sometidas al tratamiento. Durante las primeras semanas de este tratamiento algunas mujeres se quejaron de irritación nasal local y dolores de cabeza de pequeña duración, cuando la dosis de buserelina era de 400 microgramos. Otras mujeres amenorreicas, que recibieron la misma dosis, desarrollaron síntomas de deficiencia estrogénica excesiva (49).

Uno de los problemas más importantes, es el de encontrar la dosis umbral que tenga los efectos de infertilidad efectivos, pero que a la vez no presente efectos secundarios en los senos y en el endometrio. Es bien sabido que la estimulación estrogénica excesiva, no contrarrestada fisiológicamente, puede presentar problemas de tipo carcinogénico, debido a la hiperplasia producida por los altos niveles de estrógenos.

La presencia de la estimulación estrogénica no contrarrestada fisiológicamente, así como los síntomas de deficiencia estrogénica, dependen de la idiosincrasia de cada paciente por lo que los efectos secundarios no se presentan en todos

los tratamientos (43,49). Otro de los problemas que se observan, es el del comportamiento impredecible del desarrollo folicular en mujeres amenorreicas, en donde se corre el riesgo de un embarazo imprevisto.

Los datos más recientes de los tratamientos con busirelina indican que la dosis de 200 microgramos es suficiente para producir un efecto anticonceptivo efectivo (49).

5.1.2 EFECTOS POSTOVULATORIOS.

5.1.2.1 INDUCCION DE LA LUTEOLISIS.

Muchos de los agonistas actuales, están recibiendo gran atención, ya que basándose en su capacidad de inducir la luteólisis, pueden ser utilizados como anticonceptivos inhibidores de la fase lútea, conduciendo con ello a una menstruación anticipada (7,44,54,55).

Este efecto luteolítico de la GnRH y sus superanálogos fue primero observado en ratas y primates. Los primeros hallazgos indicaban, por ejemplo, que varios análogos tenían la capacidad de suprimir la función lútea y de acortar el intervalo intermenstrual en el mandril hembra no preñado (56). En esta misma especie, pero con animales preñados, también se encontró que la administración de superanálogos provocaba la interrupción del embarazo debido fundamentalmente a la luteólisis.

sis (57). Este efecto ha sido probado en humanos (58) obteniéndose resultados diferentes, pues se ha logrado suprimir la función lútea y provocar fases luteales cortas en mujeres no preñadas, pero en mujeres embarazadas no se ha podido provocar la interrupción de la gestación, pues el efecto luteolítico del agonista es contrarrestado por el potente efecto luteotrófico de la hCG que empieza a producirse muy temprano en el embarazo (35,59).

La determinación de las condiciones de la administración de los superanálogos, ha sido objeto de muchos estudios clínicos. Los primeros estudios fueron realizados mediante la administración subcutánea de 50 a 100 microgramos de análogo de GnRH, 1 a 3 días consecutivos a la altura de la mitad de la fase lútea (60,61).

Otro aspecto que ha recibido gran atención por muchos investigadores ha sido la determinación del día o los días en que se obtiene la máxima efectividad luteolítica. Los resultados de estos estudios han revelado que la administración debe realizarse siempre entre el sexto y el noveno día posteriores al pico de LH, predecesor de la ovulación.

Los estudios en que la administración fue realizada entre el primero y cuarto días después del surgimiento de la LH preovulatorio, dieron resultados negativos en lo que se refiere

re a la capacidad de inducir el acortamiento de la fase lútea. De esta forma se ha pensado que aparentemente el cuerpo lúteo, al inicio de su formación es de alguna manera refractario al efecto luteolítico de los análogos y de la GnRH misma (57,59, 62).

El mecanismo del efecto luteolítico de la GnRH y sus superanálogos no es conocido con claridad. Los datos experimentales sugieren tres posibles acciones: desensibilización directa de la hipófisis, inhibición de la producción de receptores gonadales a la LH y una inhibición directa de la GnRH sobre la esteroidogénesis ovárica (63,64,65).

Uno de los datos fundamentales que ha dado origen a estas hipótesis, es el hecho de que concomitantemente a la regresión del cuerpo lúteo y la luteólisis, se ve una disminución anticipada de los niveles corporales de los estrógenos y la progesterona. Este hecho es el que en realidad produce la menstruación anticipada y por lo tanto un acortamiento en la duración de la fase lútea. En promedio, el número de días en que se ve acortada la fase lútea es de 3 a 4 días.

La dosis empleada va de acuerdo al análogo utilizado. Por ejemplo, la busarelina, ha sido administrada intranasalmente, 2 veces por día, en una dosis de 200 y 500 microgramos. Usando estas dosis, después de 4 días de la administración, la con

centración de progesterona declina rápidamente. Hasta ahora no se han observado efectos indeseables y después del tratamiento la persona vuelve a tener ciclos normales (66).

Se desconoce el mecanismo que explique la máxima sensibilidad del cuerpo lúteo a sufrir luteólisis entre los días 6 y 9 después del surgimiento de LH, pero es posible especular que un aumento en la red vascular del cuerpo lúteo, haga más fácil el acceso del análogo a las células luteales, mecanismo que se lleva a cabo cuando esta red alcanza su máximo crecimiento, entre los días 5 y 8 después de la ovulación (23,67).

Para que se pueda validar el uso potencial de los superanálogos de la GnRH en el tratamiento anticonceptivo postcoito (interceptivo) en el humano, es necesario realizar estudios cuidadosos y minuciosos en mujeres que tengan sólo unos cuantos días de embarazo. Con el objeto de imitar el aumento de la secreción de hCG y la función del cuerpo lúteo observado durante el inicio del embarazo, se puede administrar hCG en cantidades que vayan incrementándose paulatinamente. Se ha observado que antes de la cuarta semana después del último período menstrual esperado, los niveles de hCG se encuentran usualmente bajos, a la altura de 100 mUI/ml. En base a ésto es muy importante que se estudie el efecto que tiene el programa o la secuencia de administración de una dosis óptima del análogo

a diferentes concentraciones de hCG (68,69).

Además de esto es necesario, llevar a cabo estudios simulados que utilicen superanálogos más potentes que los utilizados actualmente. Hoy en día, ya hay varios análogos que han sido estudiados y que prometen resultados más efectivos, reproducibles y a dosis mucho más bajas (70).

5.2 ANALOGOS DE LA GnRH COMO ANTICONCEPTIVOS UTILIZADOS EN MACHOS.

La función fisiológica de la GnRH fue confirmada con el establecimiento del radioinmunoensayo (71), que identificó claramente su presencia en la sangre del sistema porta de la región hipofisiotrófica (72). El papel obligatorio de la GnRH en la síntesis y liberación de gonadotrofinas fue ampliamente aceptado después de demostrar que durante la administración intravenosa de GnRH como antígeno en donde se generan anticuerpos, se observó la atrofia testicular (71) en ratas, hamsters y perros (73). A partir del advenimiento de técnicas novedosas, la síntesis de nuevos análogos de la GnRH de mayor potencia que ésta, ha progresado mucho así como el entendimiento de su fisiología como regulador de la secreción de gonadotrofinas tanto en animales como en humanos (74,75).

Se ha llegado a pensar que el uso de análogos potentes

de la GnRH puede representar una nueva terapia para el tratamiento de la infertilidad humana masculina (74). En un principio hubo dificultades que se atribuyeron a los "efectos paradójicos" de los análogos agonistas de la GnRH y que han sido ampliamente descritos en muchas investigaciones (71,74,76-83, 84-89). Mediante la administración pulsátil de GnRH a intervalos y concentraciones controladas, se ha logrado superar en gran parte estos efectos paradójicos, obteniéndose resultados satisfactorios.

En contraste a los efectos observados en hembras; en los machos, parece haber diferencias muy marcadas entre especie y especie con respecto a la respuesta a la GnRH. Uno de los extremos está representado por el "maccaco", que ha sido aceptado tradicionalmente como uno de los patrones de referencia para pronosticar los efectos de muchas drogas en humanos, pero en este caso ha demostrado ser muy resistente a los efectos supresivos de la GnRH sobre la espermatogénesis. Las ratas, por otro lado, ocupan un lugar intermedio, mientras que el perro responde a la GnRH con una oligospermia extrema como también lo hace el humano.

Debido a esta gran variabilidad entre las especies, los investigadores se encuentran en el dilema de qué animal utilizar para extrapolar los efectos al humano (76,90). A pesar de

que el panorama es un poco complicado, no debe perderse de vista, el hecho de que todos estos efectos son una función directa de la dosis, duración del tratamiento, formas de administración y potencia del agonista (90).

5.2.1 INHIBICION DE LOS RECEPTORES TESTICULARES PARA LAS GONADOTROFINAS.

Es bien sabido, que la GnRH actúa a través de la estimulación de la síntesis de gonadotrofinas a nivel hipofisiario. Si existe una descarga fuerte de gonadotrofinas (específicamente LH) por un exceso de GnRH, los receptores testiculares para esta hormona disminuirán considerablemente. Este efecto se observa con la administración de agonistas potentes de la GnRH en ratas y humanos, además de verificarse una disminución en el peso testicular, en el peso de las glándulas accesorias reproductivas y en la concentración de la testosterona (74).

5.2.2 INHIBICION DE LA ESTEROIDOGENESIS TESTICULAR Y DE LA ESPERMATOGENESIS.

La administración de los agonistas potentes de la GnRH, como la buserelina, disminuye los niveles de la testosterona plasmática. Para analizar la vía esteroideogénica durante la desensibilización inducida por el tratamiento con agonistas

de la GnRH, es necesario primero examinar el curso que sufren las concentraciones testiculares y plasmáticas de esteroides a través de sus intermediarios, después de la administración diaria de dicho agonista (74). Los cambios en los niveles de los receptores testiculares para la LH, FSH y PRL, se han correlacionado con los cambios en la esteroidogénesis (74,91).

La proporción de 17-OH progesterona disminuye rápidamente después del tratamiento, sugiriendo que la inhibición en la actividad de la 17-hidroxilasa (74,91) no sólo se presenta en ratas macho sino que también se presenta en el hombre.

Por otro lado, la situación en el hombre difiere de aquella encontrada en la rata, pues en este animal, se observa un aumento en el 3-alfa-androstano, 17-beta-diol, aumento que no se observa en el humano (91).

Después de determinar que el tratamiento con GnRH o sus agonistas potentes tienen un efecto fuertemente inhibitorio sobre los niveles de los receptores testiculares y la esteroidogénesis (36,73,74,90-93), se observó el efecto de dicho tratamiento sobre la espermatogénesis en ratas macho. Después de una semana de tratamiento con 100 nanogramos de D-Ala-LHRH etilamida, dos veces por semana, no se observaron alteraciones histológicas de gravedad en los testículos, excepto por algunos cambios regresivos en unos cuantos túbulos seminife-

ros. Sin embargo, después de 2 a 8 semana de tratamiento, se observaron cambios histológicos muy marcados.

A la segunda semana, muchos de los túbulos exhibían cambios degenerativos e interrupción en la asociación celular, aunque algunos túbulos parecían relativamente normales y muchos espermatozoides fueron encontrados en el epidídimo. Después de 4 semanas de tratamiento, los cambios histológicos fueron más dramáticos, casi todos los túbulos mostraban signos de regresión. En aproximadamente el 25% de los túbulos, el proceso degenerativo estaba muy avanzado mostrando ausencia total de células germinales (74,80), y sólo unos pocos espermatozoides fueron encontrados en el epidídimo. Después de la octava semana de tratamiento, todos los túbulos mostraban cambios degenerativos. Sin embargo, en ningún momento se observaron cambios morfológicos en las células de Leydig, es decir, que éstas retuvieron su apariencia normal (74).

En humanos, después de administrar diariamente por vía subcutánea 50 microgramos de GnRH o algún agonista, la densidad espermática disminuyó un 70% o más en cada uno de los pacientes tratados (92). La disminución o la baja en el número de espermatozoides fue acompañada por una caída significativa de la movilidad espermática. La patogénesis de esta caída en la movilidad espermática, no es aún conocida, pero se

ha sugerido que esté relacionada con la inhibición profunda y marcada de la biosíntesis de la testosterona.

En estos estudios, fué de gran importancia seguir el curso de la disminución en la concentración de la testosterona plasmática y la densidad espermática, ocurriendo la primera dos semanas después del tratamiento, mientras que la segunda se observó después de la sexta a la décima semanas del tratamiento. La recuperación de estas dos características también mostró cierta disociación, siendo los niveles de testosterona los que tardaron menos en normalizarse, lo que sugiere, que el intervalo requerido para la espermatogénesis es mucho mayor que aquel requerido para la esteroidogénesis.

5.2.3 EFECTOS INDESEABLES Y PERSPECTIVAS.

Los efectos secundarios de más importancia, son los referidos al comportamiento sexual del hombre, pérdida de la "libido" y de la potencia (73,74,90-94).

A pesar de que los efectos del tratamiento con GnRH o sus análogos son reversibles, el problema de la pérdida de la "libido" y de la potencia, es difícil de resolver en casi todos los casos, y, se presenta como el impedimento más importante para el desarrollo de un anticonceptivo masculino aceptable(94).

Es indudable de que los análogos de la GnRH pueden suprimir efectivamente la espermatogénesis y convertir en infértil a un hombre por el tiempo que dure el tratamiento. Sin embargo la pérdida de la "libido" será común, debido a la inhibición de la secreción de gonadotrofinas y los bajos niveles de testosterona. Entonces, a menos de que se quiera convertir al hombre en un simple "procreador temporal", los análogos de la GnRH: hasta ahora no pueden ser recomendados como método anticonceptivo masculino.

De los hechos presentados en esta sección, parece, que los análogos de la GnRH tienen desafortunadamente los mismos efectos indeseables producidos por otros candidatos a la anticoncepción masculina, por lo que es necesario un tratamiento con reemplazo androgénico, para poder tornar en un método aceptable la anticoncepción por medio de la GnRH o sus análogos.

5.3 ANALOGOS ANTAGONISTAS DE LA GnRH COMO POSIBLES AGENTES ANTICONCEPTIVOS.

En un principio cuando se pensó en la molécula de la GnRH como la base para encontrar un nuevo método anticonceptivo, todo el esfuerzo dedicado para encontrar el análogo ideal capaz de inhibir la ovulación, se centró en el campo de los antagonistas.

El resultado de todo este trabajo fue la síntesis de numerosos análogos antagonistas de la GnRH que al ser sometidos a estudios clínicos resultaron ser insuficientemente potentes para tener real utilidad clínica (95-97). Este último hecho aunado al sorprendente descubrimiento de que los análogos antagonistas administrados crónicamente se tornaban en antagonistas mucho más potentes que los antagonistas hasta ese momento sintetizados, desvió la atención de muchos investigadores hacia el campo de los análogos agonistas de la GnRH. Fue por esto que durante varios años poco esfuerzo fue realizado en la síntesis de nuevos análogos antagonistas. Sin embargo, recientemente ha renacido el interés en este campo gracias a la síntesis de una nueva generación de análogos de la GnRH con alta potencia antagonística. Dos ejemplos de estos antagonistas son el $(\text{Ac}-\Delta^3\text{-Pro}^1, \text{p-F-D-Phe}^2, \text{D-Trp}^{3,6})\text{LHRH}$ y $(\text{Ac}-\Delta^3\text{-Pro}^1, \text{p-Cl-D-Phe}^2, \text{D-Trp}^{3,6}, \text{N-Me-Leu}^7)\text{LHRH}$ (98-101) que han exhibido propiedades antiovlatorias y antigestacionales a dosis de microgramos. Otros investigadores han descrito que la administración oral de otro antagonista sintético a dosis de 2 miligramos bloquea el surgimiento preovulatorio de la LH en las ratas (102), cuya estructura es: $(\text{N-Ac-D-pCl-Phe}^{1,2}, \text{D-Trp}^3, \text{D-Arg}^6, \text{D-Ala}^{10})\text{LHRH}$.

Hay datos experimentales que indican que la acción anta-

gonista de estos análogos es mediada por una rápida disminución en la cantidad de sitios de unión disponibles para la GnRH en la hipófisis (103). Esta hipótesis se basa en la observación de que una sola inyección subcutánea de uno de estos antagonistas, disminuye rápidamente (30 minutos) la cantidad de sitios de unión para la GnRH sobre el gonadótropo y consecuentemente la LH sérica se ve disminuida. Todos estos estudios refieren suficientes evidencias para considerar a los nuevos antagonistas de la GnRH como instrumentos útiles para el estudio de la relación hipotálamo-hipófisis, o como agentes potenciales en la rama anticonceptiva.

5.4 APLICACIONES CLINICAS.

El descubrimiento de la estructura química de la hormona liberadora de las gonadotropinas y de su disponibilidad como hormona sintética con actividad biológica completa dió lugar a la realización de innumerables ensayos clínicos de esta hormona tanto en hombres como en mujeres (104-112). De esta manera se han realizado pruebas diagnósticas para evaluar el estado fisiológico de la hipófisis (113,114), además de iniciar la búsqueda de medios terapéuticos para la infertilidad (115, 116).

Una de las áreas de investigación en la que se ha puesto

más énfasis es el que representa a aquellos padecimientos caracterizados por un hipogonadismo originado a nivel hipotalámico, es decir, por una deficiencia en GnRH endógeno (117-119).

5.4.1 MUJERES.

Además del uso como anticonceptivo de la GnRH, los investigadores han puesto mucho interés en el uso de este neuropéptido como agente potencial para el tratamiento de numerosos padecimientos tales como la amenorrea primaria y secundaria, la endometriosis y otros.

5.4.1.1 INDUCCION DE LA OVULACION.

La activación de las funciones cíclicas ováricas en pacientes con amenorrea hipogonadotrópica representa uno de los retos más importantes en el manejo clínico de la infertilidad. Se pensó que la GnRH y sus análogos agonistas pudieran tener valor terapéutico en mujeres con infertilidad hipogonadotrópica. Esta aseveración resultó de un gran número de observaciones clínicas: a) la ovulación fue inducida en pacientes con anorexia nervosa y anovulación hipogonadotrópica mediante inyección diaria de GnRH (120,121); b) el hipogonadotropismo hipotalámico fisiológico del puerperio ha sido revertido tempranamente (dentro de los primeros 10 días) por medio de la admi

nistración de agonistas de la GnRH a intervalos de 72 horas aún en la presencia de hiperprolactinemia (122); c) se ha logrado inducir el surgimiento significativo de las gonadotropinas en mujeres normales después de una inyección de 50 microgramos del agonista (D-Trp⁶, Pro⁹)etilamida, LHRH) (123); d) en pacientes con amenorrea hipogonadotrópica se ha logrado inducir la liberación de gonadotropinas en la activación concomitante de la esteroidogénesis folicular (1) mediante la administración de varios agonistas de la GnRH. Sin embargo, a pesar de los resultados positivos de todos estos estudios, no se ha podido inducir una maduración folicular secuencial reproducible a largo plazo.

Todos estos problemas se han resuelto satisfactoriamente mediante el uso de una bomba portátil automática diseñada para dosificar un pulso de GnRH cada 60 a 120 minutos (124-128). En todos estos estudios se ha logrado inducir la ovulación en forma satisfactoria y reproducible, usando condiciones y dosis de GnRH muy variadas que van desde un microgramo hasta 100 microgramos/pulso.

Aunque la incidencia de la ovulación y embarazo ha sido impresionante es necesario todavía realizar estudios para poder encontrar las condiciones óptimas tanto de dosis como de frecuencia de administración que pueden garantizar la efecti

vidad y ausencia de reacciones secundarias en los pacientes tratados.

5.4.1.1.1 AMENORREA PRIMARIA.

Este tipo de amenorrea es ocasionada por alteraciones en el desarrollo genital o por trastornos graves en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Se ha discutido mucho hasta qué edad se puede establecer el diagnóstico de la amenorrea primaria e iniciar el tratamiento, y, arbitrariamente se ha limitado a una edad de 18 años. Sin embargo, cuando la falta de menstruación se acompaña de alteraciones somáticas congénitas y/o de infantilismo sexual, el estudio y diagnóstico deben iniciarse de inmediato, sin tomar en cuenta la edad.

Se ha intentado tratar este padecimiento, con la administración de buserelina intranasalmente, con un régimen posológico de 3 días/semana, observándose un aumento de LH durante los primeros 21 días de tratamiento.

Después se observa una reducción gradual pero no total de esta hormona, la concentración de estrógenos disminuye considerablemente, sugiriéndose la existencia de una acción inhibitoria del análogo sobre la biosíntesis de los estrógenos en el ovario y la inhibición de los receptores de otros órganos genitales (129).

5.4.1.1.2 AMENORRHEA SECUNDARIA.

En una mujer que está menstruando regularmente, puede presentarse un período en el cuál se suspende la menstruación, y, cuando este período se prolonga por más del equivalente a 3 ciclos, se le denomina amenorrea secundaria. El síntoma puede instalarse de forma súbita o bien puede ser precedido por irregularidades menstruales de poca magnitud, siendo esto último lo más frecuente. La amenorrea secundaria no es sino la manifestación de un trastorno a cualquier nivel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario-endometrio, que con anterioridad funcionaba normalmente (130).

Para el tratamiento de este padecimiento, se ha administrado intranasalmente la busserlina en dosis de 87 microgramos, con diferentes patrones de administración durante los ciclos menstruales (131-134).

5.4.1.2 ENDOMETRIOSIS.

Se entiende por endometriosis, la presencia ectópica de tejido endometrial, es decir, fuera de la cavidad uterina.

Habitualmente se localiza en los ovarios, el peritoneo pélvico, los ligamentos uterosacros, el fondo del saco peritoneal anterior y el fondo del saco peritoneal posterior. En algunas ocasiones, las áreas de endometriosis pueden sufrir un

crecimiento considerable con sangre en su interior, recibiendo en estas circunstancias el nombre de endometrioma. Este padecimiento, se encuentra frecuentemente relacionado con problemas de esterilidad (130).

Este padecimiento se ha tratado con esteroides como el danazol y quirúrgicamente con la ovariectomía bilateral (135).

Tomando en cuenta que la administración continua de los agonistas de la GnRH produce una supresión de la actividad ovárica e hipofisiaria que da origen a una aciclicidad y amenorrea, se ha propuesto que estos agonistas pudieran ser un medio efectivo para tratar a la endometriosis (136,137) evitando con esto los efectos colaterales que traen como consecuencia los métodos que anteriormente fueron descritos para tratar este padecimiento.

Uno de los estudios clínicos que apoyan esta proposición (136) es en el que se trató a 5 mujeres con endometriosis pélvica. La administración diaria de 100 microgramos de un agonista de la GnRH por 4 semanas redujo a niveles de castración los estrógenos y andrógenos ováricos. Mediante este tratamiento se logra inducir una "ovariectomía farmacológica" reversible. Sin embargo, se requiere realizar estudios comparativos y más extensos en los cuales se pueda determinar la superioridad del tratamiento a base de estos análogos con respecto a los actual

mente usados (137,138).

5.4.1.3 CANCER MAMARIO.

En la actualidad se está investigando si la castración farmacológica inducida por los agonistas de la GnRH puede ser útil en el tratamiento del cáncer mamario metastático en pacientes premenopausicas.

En ratas se ha logrado promover la regresión de los tumores mamarios inducidos por el dimetilbenzantraceno mediante el tratamiento con agonistas de la GnRH(139). Hasta ahora solamente se ha reportado un solo caso de cáncer mamario humano tratado con GnRH (140); en este estudio se sometieron a tratamiento a 4 mujeres premenopáusicas con cáncer mamario metastático postmastectomía con buserelina administrada en dosis intravenosas de 3 miligramos/día durante 7 días, seguido por la administración intranasal (200 microgramos, 3 veces/día) por siete semanas. Solamente dos pacientes mostraron clara mejoría mientras que los otros dos no presentaron cambio alguno.

5.4.1.4 SUPRESION DE LA HIPERSECRECION ANDROGENA POR LOS OVARIOS.

Se ha establecido que en el síndrome poliquístico ovárico hay una hipersecreción de andrógenos por los ovarios, pero

no se ha podido saber si a este efecto contribuyen de alguna manera las glándulas suprarrenales. Mediante la administración continua de un agonista de la GnRH se ha podido discriminar entre la contribución adrenal y ovárica a la concentración total de andrógenos circulantes en pacientes con síndrome poliquístico ovárico (1). En estos estudios se encontró que los agonistas de la GnRH son capaces de disminuir la androstenediona, la testosterona, el estradiol y la estrona, a niveles de castración, después de 28 días de tratamiento con 100 microgramos diarios de algún agonista. Los niveles de los andrógenos adrenales no se vieron afectados por este tratamiento.

Los niveles de LH no se vieron alterados por este tratamiento, no obstante la abolición de esteroides ováricos, sugiriendo esto una acción directa de los agonistas sobre el ovario. Este punto ha sido apoyado por estudios in vitro en los que la esteroidogénesis de cultivos de células de la granulosa humanas se ha podido inhibir con el tratamiento por 6 o 7 días de la GnRH o sus agonistas (141,142).

Estos estudios condujeron a buscar un tratamiento de tumores productores de andrógenos tales como el arrhenoblastoma que ha sido inhibido efectivamente por estos análogos (143).

5.4.2 HOMBRRES.

Durante mucho tiempo ha sido de mucha importancia inducir el desarrollo de las características sexuales secundarias en individuos con deficiencias en la producción de gonadotropinas. En el pasado se han intentado tratamientos a base de hCG en combinación con gonadotropina menopáusica humana; sin embargo, la terapia a largo plazo ha fallado en provocar una virilización y desarrollo testicular adecuado. Por lo tanto, la terapia que han escogido muchos clínicos ha sido el uso de derivados de la testosterona de acción prolongada para inducir la virilización completa, no obstante que los testículos continúan en estado hipoplástico (144).

El mejorar la capacidad reproductiva ha sido uno de los principales objetivos en pacientes con gónadas normales pero con problemas de infertilidad debido a defectos primarios localizados en el hipotálamo.

5.4.2.1 HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓPICO.

El hipogonadismo hipogonadotrópico es una enfermedad caracterizada por la virilización incompleta, pubertad no desarrollada, bajos niveles de gonadotropinas, y gónadas histológicamente capaces de responder a la estimulación trópica.

El uso de la GnRH y sus análogos como tratamiento de esta enfermedad ha sido estudiada por muchos investigadores usan

do una gran variedad de dosis y de condiciones de administración (145-148).

Hasta ahora los resultados han sido muy variados y algunos han reportado que los tratamientos a base de GnRH han sido adecuados (114,149-152) logrando que estos pacientes desarrollen características sexuales secundarias normales además de que sus órganos sexuales alcanzan un desarrollo cercano al normal. También se han obtenido resultados desalentadores pues otros investigadores (147,153,154) no han logrado desarrollar los cambios morfológicos y fisiológicos esperados.

Actualmente la administración pulsátil de GnRH ha resuelto esta variabilidad de resultados. En estudios a corto plazo (5 días) administrando GnRH (0.025 microgramos/kg) cada 2 horas, activa la secreción de gonadotropinas y de testosterona (155,156).

Resultados más concluyentes se han obtenido en estudios a largo plazo (30 a 60 semanas), en los cuales se ha administrado la GnRH en forma pulsátil y se ha logrado inducir la función testicular y la espermatogénesis (157,158), habiéndose descrito también la fertilidad efectiva en uno de estos pacientes (157).

Cuando un paciente presenta hipogonadismo hipogonadotrópico asociado con anosmia se dice que sufre del síndrome de

Kallmann (150). Se cree que esta enfermedad es el resultado de un desarrollo defectuoso del área olfatoria del cerebro y del sitio encargado de producir la GnRH en el hipotálamo. Estos pacientes presentan niveles bajos de esteroides sexuales y de gonadotrofinas así como órganos sexuales y características sexuales secundarias subdesarrolladas. En estos casos la administración de GnRH origina un aumento en los niveles de las gonadotrofinas y de un mejoramiento de la función gonadal. En el hombre se observa el desarrollo de la potencia sexual y de la espermatogénesis, mientras que en la mujer se logra la ovulación y existen casos de mujeres con este síndrome, que han logrado embarazarse (150,159).

5.4.2.2 CRIPTORQUIDISMO Y OLIGOSPERMIA.

Otra aplicación muy importante que ha tenido la GnRH y sus análogos ha sido en el desarrollo de una terapia adecuada para tratar el criptorquidismo (118,160,161). Con este tratamiento los resultados han sido variados y se ha encontrado que existen individuos que no responden bajo una gran variedad de condiciones de administración a la GnRH (162). La gran mayoría de estos pacientes (80%) responden satisfactoriamente al tratamiento con hCG (1500 IU administradas intramuscularmente por semana durante 3 semanas).

Los pacientes que sufren de diferentes estados de oligospermia han sido tratados con GnRH y sus análogos obteniéndose resultados variables pues se han observado deficiencias más bien gonadales que de tipo hipotálmico (163,164,165).

5.4.2.3 CANCER PROSTATICO.

Debido a que los agonistas potentes de la GnRH producen atrofia prostática, y una reducción en los niveles de la testosterona, en una gran variedad de especies, se ha sugerido el uso de los agonistas de la GnRH en el tratamiento del carcinoma prostático dependiente de los andrógenos y de la hiperplasia prostática en el hombre.

En estudios realizados por Faure, se evaluaron los cambios hormonales en pacientes con cáncer de la próstata antes y después de la administración intranasal o subcutánea de un agonista de la GnRH (buserelina) por un período de tiempo de 1 a 8 meses, se logró disminuir la testosterona circulante a niveles de castración (166).

En otro estudio (167), nueve pacientes con carcinoma avanzado de la próstata fueron tratados con Buserelina a una dosis de 2 mg./día, subcutáneamente durante 3 días, seguido de una dosis de mantenimiento de 0.4 a 1.2 mg./día administrados intranasalmente por 24 semanas. Este tratamiento produjo cam-

bios regresivos en el carcinoma similares a los observados en pacientes que han sido castrados quirúrgicamente. Resultados similares han sido obtenidos por Tolia, en el tratamiento de cáncer prostático metastático y no metastático (168).

Para que se pueda considerar a los agonistas de la GnRH como agentes potenciales en el tratamiento del cáncer prostático, se han tenido que hacer estudios comparativos que demuestran la superioridad de este tratamiento sobre el uso de los antiandrógenos y de los métodos quirúrgicos (169). La carencia de efectos secundarios de este tratamiento y la habilidad para inhibir el crecimiento de estos tumores lo convierte en el tratamiento de elección en el futuro (170).

5.5. APLICACIONES DIVERSAS EN AMBOS SEXOS.

5.5.1 PUBERTAD RETARDADA.

Algunos investigadores han intentado usar a la GnRH y sus agonistas para activar al sistema hipofisiario-gonadal en pacientes con pubertad retardada idiopática.

Jakacki et.al. han demostrado que la LH es secretada normalmente con un patrón pulsátil mucho antes del inicio de la pubertad y que las características del patrón de secreción de las gonadotropinas en la pubertad resultan de la amplificación

del patrón de liberación ya existente (171). Además, la activación de la secreción de gonadotrofinas por la hipófisis y de una ciclicidad ovárica apropiada ha sido lograda en monos inmaduros mediante la administración pulsátil de GnRH. La activación de la secreción pulsátil de gonadotrofinas asociada a un incremento en los niveles de estradiol han sido logrados mediante la administración de GnRH pulsátilmente a dosis muy bajas (173).

5.5.2 PUEBERTAD PRECOZ.

Muchas evidencias sugieren que el patrón de cambios neuroendócrinos responsables de la activación del eje hipotálamo-hipófisis en niños y niñas con pubertad precoz verdadera es funcionalmente similar al observado durante la pubertad normal (174).

Muchas drogas, fundamentalmente agentes progestacionales han sido usados para desacelerar la maduración sexual y por lo tanto para prevenir el cierre prematuro de las epífises que resulta en la inhibición del crecimiento normal de los niños (1).

En 1980, Crowley et.al. fueron los primeros en describir la supresión nocturna de la liberación de gonadotrofinas, después de un período de tratamiento de 8 semanas con un agonista de la GnRH con una dosis de 4 microgramos/kg/día administrados

subcutáneamente en una niña de 2 años de edad con pubertad precoz (175). Otros investigadores (176) trataron satisfactoriamente a 5 niñas con pubertad precoz idiopática (2 a 8 años de edad) durante 8 semanas con inyecciones subcutáneas diarias del (D-Trp⁶, desGly)etilamida LHRH (4 microgramos/kg/día). Estos resultados favorables obtenidos en estudios a corto plazo han sido extendidos por el mismo grupo de investigadores, y en 80 pacientes tratados con este agonista se ha logrado revertir este padecimiento satisfactoriamente sin efectos secundarios (177).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Yen, S.S.C. Clinical applications of gonadotropin releasing hormone and gonadotropin releasing hormone analogs. *Fertil.Steril.* 39:257-266, 1983.
- 2.- Guyton, A.C. Textbook of Medical Physiology. Fifth edition. W.B.Sanders Co. Philadelphia, 1976. pp.988-1004.
- 3.- Spellacy, W.N., P.S.Kalra, S.A.Birk. Prospective studies of the gonadotropin responses to graded injections of gonadotropin releasing factor in women using a low estrogen contraceptive for three months. *Fertil.Steril.* 32:661-663, 1979.
- 4.- Garmendia, F., E.Kesseru, E.Urdanivia, M.Valencia. Luteinizing hormone and progesterone in women under postcoital contraception with D-norgestrel. *Fertil.Steril.* 27:1250-1255, 1976.
- 5.- Ash, R.H., J.P.Balmaceda, C.A.Eddy, T.Siler-Khodr, D.H.Coy, A.V.Schally. Inhibition of the postcastration rise of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in female rhesus monkey (*Macaca mulata*) by the administration of luteinizing hormone releasing hormone inhibitory analog (N-Ac-D-Trp^{1,3}, D-P-C1Phe², D-Phe⁶, D-Ala¹⁰)LHRH. *Fertil.Steril.* 36:388-391, 1981.
- 6.- Stuart, J.M. Pharmacology of LHRH and analogs. En LHRH

peptides as female and male contraceptives, editado por G.Zatuchni, D.Shelton, J.J.Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp. 2-12.

- 7.- Corbin, A., F.J. Bex. Physiology and contraceptive effects of LHRH and agonistics analogs in female animals. En LHRH peptides as female and male contraceptives, editado por G.Zatuchni, D.Shelton, J.J.Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp.68-84.
- 8.- Schally, A.V., D.H.Coy, A.Arimura. LHRH agonist and antagonists. Int.J.Gynecol.Obstet. 18:318-330, 1980.
- 9.- Schally, A.V., D.H.Coy, C.A.Meyers, Hypothalamic regulatory hormones. Ann.Rev.Biochem. 47:89-128, 1978.
- 10.- Vale, W., C.Rivier, M.Brown. Regulatory peptides of the hypothalamus. Ann.Rev.Physiol. 39:473-527, 1977.
- 11.- Coy, H.D., M.B.Nekola, J.Erceggii, E.J.Coy, A.V.Schally. Contraceptive effects of potent LHRH antagonist analogs. En LHRH peptides as female and male contraceptives, editado por G.Zatuchni, D.Shelton, J.J.Sciarra. Harper and Row publishers, 1981, pp.37-45.
- 12.- Bowers, C.Y., K.Folkers, K.Friebel, W.Lutz, G.A.Rainolds, P.Mo many. A critique on analog antagonist of LHRH. En LHRH peptides as female and male contraceptives, editado por G.Zatuchni, D.Shelton, J.J.Sciarra. Harper and Row publi -

shers, 1981. pp.46-62.

- 13.- Banik, U., M.L.Givner. Effects of a luteinizing hormone releasing hormone analog on mating and fertility in rats. *Fertil.Steril.* 27:1078-1084, 1976.
- 14.- Corbin, C., C.W.Beattie. Effect of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and LHRH antagonist on hypothalamic and plasma LHRH of hypophisectomized rats. *Endocrinology* 98:247-250, 1976.
- 15.- Labrie, F., M.Savary, D.E.Coy, E.J.Coy, A.V.Schally. Inhibition of luteinizing hormone release by analogs of LHRH in vitro. *Endocrinology* 98:289-294, 1977.
- 16.- Wurtman, R.J., A.Moskowitz. The pineal organ. *New England Journal of Medicine* 296:1329-1333, 1977.
- 17.- De la Cruz, A., D.H.Coy, J.A.Vilchez-Martínez, A.Arimura, A.V.Schally. Blockade of ovulation in rat by inhibitory analogs of LHRH. *Science* 191:195-197, 1976.
- 18.- Castro, A., S.M.McCann. Cyclic variations in the increased responsiveness of the pituitary to the luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) induced by LHRH. *Endocrinology* 97:13-19, 1975.
- 19.- Kledzik, G.S., L.Cusan, C.Audair, R.A.Kelly, F.Labrie. Inhibition of ovarian luteinizing hormone and follicle stimulating hormone agonist during estrous cycle in the rat.

Fertil.Steril. 30:348-353, 1978.

- 20.- Kawamura, Y., A. Miyake, T. Aono, K. Kurachi. Plasma LHRH levels in normal women and patients with amenorrhea. Fertil.Steril. 34:444-447, 1980.
- 21.- Topozada, M., C. Paramar, K. Potherby. Effect of injectable contraceptive depovera and norethisterone oenanthate on pituitary gonadotropin response to LHRH. Fertil.Steril. 30:545-548, 1978.
- 22.- Gonzalez Bärkena, D., A. J. Kastin, D. S. Schalch, D. H. Coy, A. V. Schally. Prolonged elevation of LH after intranasal administration of an analog of LHRH. Fertil.Steril. 27:1246-1249, 1976.
- 23.- Lamsy, A., N. Faure, P. Labrie. Induction of luteolysis by postovulatory intranasal administration of (D-Ser(TBu)⁶ desGlyNH₂¹⁰)LHRH ethylamide (buserelin): a postcoital contraceptive approach. In LHRH peptides as female and male contraceptives, editado por G. Zatuchni, D. Shelton, J. J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp.184-198.
- 24.- Corbin, A., C. W. Beattie, J. Yardley. Postcoital contraceptive effects of an agonist analogue of luteinizing hormone releasing hormone. Endocr. Res. Commn 3:359-366, 1976.
- 25.- Kledzik, G. S., L. Cusan, C. Auclair. Inhibitory effect of a luteinizing hormone (LH) releasing hormone agonist on rat

- ovarian LH and follicle stimulating hormone receptor levels during pregnancy. Fertil.Steril. 29:560-567, 1978.
- 26.- Auclear, C., P.A.Kelly, F.Labrie, D.H.Coy, A.V.Schally. Inhibition of testicular luteinizing hormone receptor level by treatment with a potent luteinizing hormone releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin. Biochem.Biophys.Res Commun. 76:855-862, 1977.
- 27.- Rippel, R.H., E.S.Johnson. Regression of corpora lutea in the rabbit after injection of a gonadotropin releasing peptide (39320). Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 152:29-37, 1976.
- 28.- Rivier, C., J.Rivier, W.Vale. Antireproductive effects of a potent GnRH antagonist in the female rat. Endocrinology 108:1425-1430, 1981.
- 29.- De la Cruz, A., K.G.De laFu, A.Arimura, D.H.Coy, J.A.Vilchez-Martinez, E.J.Coy, A.V.Schally. Gonadotropin releasing activities of two highly active and long acting analogs of luteinizing hormone releasing hormone after subcutaneous, intravaginal and oral administration. Fertil. Steril. 26:894-900, 1975.
- 30.- Sorai, J., A.Zarate, E.S.Canales, A.Ayala, A.V.Schally, D.H.Coy D.J.Coy, A.J.Kastin. Increased and prolonged LHRH/FSHRH activity of synthetic (D-Ala⁶, desGlyNH₂¹⁰)LHRH ethylamide in normal women. Am.J.Obstet.Gynecol. 123:145-146, 1975.
- 31.- Happ, J., P.Shultz, T.Weber, U.Kordes, P.Shramm, M.Neubauer,

- J. Boyer. Gonadotropin secretion in eugonadotropic human males and postmenopausal females under long term application of a potent analog of gonadotropin releasing hormone. *Fertil, Steril.* 30:674-678, 1978.
- 32.- Reel, J. R., R. R. Humphrey, W. C. Dermody. Luteinizing hormone releasing hormone versus chorionic gonadotropin: differential effect on the development of ovulatory refractoriness and antibodies. *Fertil. Steril.* 27:59-64, 1976.
- 33.- Bex, F. J., A. Corbin. Mechanism of the postcoital contraceptive effect of luteinizing hormone releasing hormone: ovarian luteinizing hormone receptor interaction. *Endocrinology* 105:139-147, 1979.
- 34.- Bex, F., J. A. Corbin. Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and LHRH agonist termination of pregnancy in hypophysectomized rats: extrapituitary site of action. *Endocrinology* 108:273-279, 1981.
- 35.- Asch, R. H., J. P. Balmaceda, C. A. Eddy, T. Sille-Kohdr, D. H. Coy, A. V. Schally. Inhibition of the postcastration rise of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in female rhesus monkey (*Macaca mulata*) by the administration of a luteinizing hormone releasing hormone inhibitory analog (Nac-D-Trp¹⁻³, D-Pcl-Phe², D-Phe⁶, D-Ala¹⁰) LHRH. *Fertil. Steril.* 36:388-391, 1981.

- 36.- Sundaram, K., N.G. Wang, C.W. Bardin. The gonadal antiestrogenic and antifertility effects of LHRH agonist in male animals. In LHRH peptides as female and male contraceptives, editado por G.Zatuchni, D.Shelton, J.J.Sciarra, Harper and Row publishers, 1981, pp. 261-274.
- 37.- Auclear, C.A., P.A.Kelly, D.H.Coy. Potent inhibitory activity of (D-Leu⁶, desGlyNH₂¹⁰)LHRH ethylamide or LH/hCG and PRL testicular receptor levels in the rat. Endocrinology 101:1890-1893, 1977.
- 38.- Beattie, C., W.A. Corbin. Pre and postcoital contraceptive activity of LHRH in the rat. Biol.Reprod. 16:333-341, 1977.
- 39.- Moghissi, K.S. Discussion: physiology and contraceptive effects of LHRH analogs in female animals: agonists. In LHRH peptides as female and male contraceptives, editado por G.Zatuchni, D.Shelton, J.J.Sciarra. Harper and Row publishers, 1981, pp.134-138.
- 40.- Arimura, A., A.J.Kastin, A.V.Schally, M.Saito, D.Tomasaka, Y. Yaoin, N.Nishi, K. Ohkura. Immunoreactive LH releasing hormone in plasma: midcycle elevations in women. J.Clin.Endocrinol, Metab. 38:510-512, 1974.
- 41.- Berquist, C., S.Nillius, L.Wide, A.Lindgren. Endometrial patterns in women on chronic LHRH agonist treatment for contraception. Fertil.Steril. 36:339-342, 1981.

- 42.- Vilchez-Mertínez, J.A., E. Pedroza, A. Arimura, A.V. Schally. Paradoxical effects of D-Trp⁶ LHRH on the hypothalamic pituitary gonadal axis in immature female rats. *Fertil. Steril.* 31:677-682, 1979.
- 43.- Maia, H. Jr., I.C. Barbosa, H. Maia Sr., E. Tironi, E.M. Coutinho. Effect of LHRH on ovulation and corpus luteum formation in women. In *LHRH peptides as female and male contraceptives*, editado por G. Zatzuchni, D. Shelton, J.J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp. 216-226.
- 44.- Koyama, T., T. Okkura, T. Kumasaka, M. Saito. Effect of post-ovulatory treatment with a luteinizing hormone releasing hormone analog on the plasma level of progesterone in women. *Fertil. Steril.* 30:549-552, 1978.
- 45.- Corbin, C., C.W. Beattie, R. Rees, J. Yardley, T.J. Foell, S.Y. Chai, H. McGregor, V. Garsky, D. Sarantakis, W.A. McKinley. Post coital contraceptives effects of agonist analogs of luteinizing hormone releasing hormone. *Fertil. Steril.* 28: 471-478, 1977.
- 46.- Yen, S.S.C., C.C.P. Tsai. Acute gonadotropin release by exogenous estradiol during the midfollicular phase of the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34:298-306, 1972.
- 47.- Drouin, J., L. Lagasé, F. Labrie. Estradiol induced increase of the LH responsiveness to the LH releasing hormone in

- rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 99:1477-1481, 1976.
- 48.- Marut, E.L., R.F. Williams, B.D. Cowan, A. Lynch, S.P. Lerner, G. D. Hodgen. Pulsatile pituitary gonadotropin secretion during maturation of the dominant follicle in monkeys: estrogen positive feedback enhances the biological activity of LH. *Endocrinology* 109:2270-2272, 1981.
- 49.- Schmidt-Gollwitzer, M., W. Hardt, K. Schmidt-Gollwitzer, M. Vonderhoe. The contraceptive use of buserelin, a potent LHRH agonist: clinical and hormonal findings. En *LHRH peptides as female and male contraceptives*, editado por G. Zatuchni, D. Shelton, J.J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp. 199-215.
- 50.- Rivier, C., J. Rivier, W.W. Vale. GnRH antagonist: physiologic and contraceptive applications in the female rat. En *LHRH peptides as female and male contraceptives*, editado por G. Zatuchni, D. Shelton, J.J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp. 140-150.
- 51.- Vickery, B.H. Female contraceptive potential of super agonist of LHRH assessed in infrahuman primates. En *LHRH peptides as female and male contraceptives*, editado por G. Zatuchni, D. Shelton, J.J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp. 109-125.

- 52.- Berquist, C., S.J. Nilius, L. Wide. Long term intranasal luteinizing hormone releasing hormone agonist treatment for contraception in women. *Fertil.Steril.* 38:190-193, 1982.
- 53.- Berquist, C., S.J. Nilius, L. Wide. Intranasal gonadotropin releasing hormone as a contraceptive agent. *Lancet* 2:215-216, 1979.
- 54.- Vickery, V.H., G.I. McRae, B.C. Sterens. Suppression of luteal and placental function in pregnant baboons with agonistic analogs of luteinizing hormone releasing hormone. *Fertil.Steril.* 36:664-668, 1981.
- 55.- Lemay, A., F. Labrie, A. Belanger, J.R. Raymond. Luteolytic effect of intranasal administration of (D-Ser(TBU)⁶, desGly¹⁰NH₂)LHRH ethylamide in normal women. *Fertil.Steril.* 32:646-651, 1979.
- 56.- Das, C., G.P. Talwar. Pregnancy terminating action of a luteinizing hormone releasing hormone agonist D-Ser(Bu)⁶, desGly¹⁰ProEA in baboons. *Fertil.Steril.* 39:218-223, 1983.
- 57.- Rivier, C., W. Vale. Interaction of gonadotropin releasing hormone agonist and antagonist with progesterone, prolactin, or human chorionic gonadotropin during pregnancy in the rat. *Endocrinology*, 110:347-351, 1982.
- 58.- Sheehan, K.L., R. Flasper, S.S.C. Yen. Induction of luteoly-

- sis by LHRH agonist, sensitivity, reproducibility, and reversibility. *Fertil.Steril.* 37:209-212, 1982.
- 59.- Tolis, G., A.M. Comarce-Schally, A.E. Metha, A.V. Schally. Failure to interrupt established pregnancy in human by D-Trp⁶ luteinizing hormone releasing hormone. *Fertil. Steril.* 36:241-242, 1981.
- 60.- Casper, R.F., S.S.C. Yen. Induction of luteolysis in the human with a long acting of (LHRH luteinizing hormone releasing factor. *Science* 205:408-409, 1979.
- 61.- Lemay, A., F. Labrie, L. Ferland, J.P. Raynaud. Possible luteolytic effects of LHRH in normal women. *Fertil.Steril.* 31:29-34, 1979.
- 62.- Sotrel, G., A. Helvacioğlu, S. Dowers, A. Scemmeña, F.J. Auleta. Mechanisms of luteolysis: effect of estradiol and prostaglandin F₂α on corpus luteum luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors and cyclic nucleotides in the rhesus monkey. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 139:134-140, 1981.
- 64.- Lemay, A., N. Faure, F. Labrie. Sensitivity of pituitary and corpus luteum responses to single and intranasal administration of (D-Ser(TBU)⁶desGlyNH₂¹⁰)LHRH ethylamide (buserelin) in normal women. *Fertil.Steril.* 37:193-200, 1982.
- 65.- Raynaud, J.P., I. Mery, M. Moguilewsky, M. Mouren, F. Labrie.

Inhibition of progesterone secretion during the luteal phase by two LHRH agonists in *Macaca fascicularis*. *Fertil. Steril.* 34:593-598, 1980.

- 66.- Sheehan, K.L., S.S.C. Yen, Clinical studies with LHRH agonists. En *LHRH peptides as female and male contraceptives*, editado por G.Zatuchni, D.Shelton, J.J.Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp.237-241.,.
- 67.- Goldzieher, J.W. Discussio: LHRH analog agonist and antagonists as antifertility agents in the human female. En *LHRH peptides as female and male contraceptives*, editado por G.Zatuchni, D.Shelton, J.J.Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp.242-243.
- 68.- Corbin, A. Further development of LHRH analogs as contraceptive agents for women. En *LHRH peptides as female and male contraceptives*, editado por G.Zatuchni, D.Shelton, J.J.Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp.382-384.
- 69.- Steinberguer, E. The future of the LHRH analogs as contraceptive agents for man. En *LHRH peptides as female and male contraceptives*, editado por G.Zatuchni, D.Shelton, J.J.Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp.376-381.
- 70.- Nestor, J.J., T.L.Ho, L.Homer, G.H.Jones, G.I.McRae, B.H.Vickey, R.A.Simpson. Synthesis and biological activity of some very hydrophobic superagonists analogs of luteinizing

- hormone releasing hormone. *J. Med. Chem.* 25:795-801, 1982 .
- 71.- Arimura, A., H. Sato, T. Kunasaka, R. B. Worobwc, L. Debeljuk, J. Dunn, A. V. Schally. Production of antiserum to LHRH associated with gonadal atrophy in rabbits: development of immunoassays for LHRH. *Endocrinology* 93:1092-1103, 1973.
- 72.- Jonathan, V. N., R. S. Mical, J. C. Porter. Superfusion of hemipituitaries with portal blood. I. LRF secretion in castrated and diestrous rats. *Endocrinology* 93:497-503, 1973.
- 73.- Vickery, V. H. Physiology and antifertility effects of LH RH and agonistic analogs in male animals. In *LHRH peptides as female and male contraceptives*, editado por G. Zatuchni, D. Shelton, J. J. Sciarra, Harper and Row publishers, 1981, pp. 275-290.
- 74.- Labrie, P., Godbout, M., A. Bélanguer, F. A. Lefebvre, C. Séguin, G. Pelletier, L. Cusan, P. A. Kelly, J. J. Reeves. Mechanisms of the antifertility effects of LHRH agonists in the male rat. In *LHRH peptides as female and male contraceptives*, editado por G. Zatuchni, D. Shelton, J. J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp. 246-260.
- 75.- Matsuo, H., Y. Babba, R. M. G. Nair, A. Arimura, A. V. Schally. Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone . I. The proposed amino acid sequence, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 43:1334-1339, 1971.

- 76.- Arimura, A., P. Serafini, S. Tablot. Reduction of testicular luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors by (D-Trp⁶) luteinizing hormone releasing hormone in hypophysectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 90: 687-693, 1979.
- 77.- Bélanger, A., C. Auclear, C. Seguin. Down regulation of testicular androgen biosynthesis and LH receptor levels by an LHRH agonist: role of prolactin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 13:47-52, 1979.
- 78.- Catt, K. J., A. J. Baukal, T. F. Davis. Luteinizing hormone releasing hormone induced regulation of gonadotropin and prolactin receptors in the testes. *Endocrinology* 104:17-25, 1979.
- 79.- Cusan, L., C. Auclear, A. Bélaguer. Inhibitory effect of long term treatment with an LHRH agonist on the pituitary-gonadal axis in male and female rats. *Endocrinology* 104: 1369-1376, 1979.
- 80.- Pelletier, G., L. Cusan, C. Auclear. Inhibition of spermatogenesis in the rat by treatment with (D-Ala,⁶ desGlyNH₂¹⁰) LHRH ethylamide. *Endocrinology* 103:641-643, 1978.
- 81.- Sandow, J., W. V. Vonrechenberg, W. König. Pituitary gonadotropin inhibition by a highly active analog of luteinizing hormone releasing hormone. *Fertil. Steril.* 30:205-211, 1978.

- 82.- Sharpe, R.M., H.M. Fraser, J. Sandow. Effect of treatment with an agonist of luteinizing hormone releasing hormone on early maturational changes in pituitary and testicular function in the rat. *J. Endocrinol.* 80:249-257, 1979.
- 83.- Tcholakian, R.K., A. De la Cruz, M. Chaowdhury, A. Steinberger, D.H. Coy, A.V. Schally. Unusual antireproductive properties of the analog (D-Leu⁶, desGlyNH₂¹⁰)LHRH ethylamide in male rats. *Fertil. Steril.* 30:600-603, 1978.
- 84.- Gosselin, R.E., B.G. Fuler, D.H. Coy, A.V. Schally, W.C. Hobson. Inhibition of gonadotropin release in chimpanzees by the LHRH antagonist (D-Phe², D-Trp³, D-Phe⁶)LHRH. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151:21-28, 1979.
- 85.- Johnson, E.F., R.L. Gendrick, W.F. White. Delayed of puberty and inhibition of reproductive processes in the rat by a gonadotropin releasing hormone analog. *Fertil. Steril.* 27:853-858, 1976.
- 86.- Happ, J., U. Hartman, T. Weber, U. Kordes, J. Boyer. Gonadotropin and testosterone secretion in normal human males after stimulation with gonadotropin releasing hormone (GnRH) or potent GnRH analogs using different modes of application. *Fertil. Steril.* 30:666-673, 1978.
- 87.- Happ, J., P. Scholz, T. Weber, U. Kordes, P. Schramm, M. Neubauer, J. Boyer. Gonadotropin secretion in eugonadotropic human

males and postmenopausal females under long term application of a potent analog of gonadotropin releasing hormone. *Fertil.Steril.* 30:674-678, 1978.

- 88.- Nankin, H.R., P. Tron. Repetitive luteinizing hormone (releasing hormone) elevation in serum of normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:558-560, 1981.
- 89.- Rippel, R.H., E.S. Johnson. Inhibition of hCG-induced ovarian and uterine weight augmentation in the immature rat by analogs of GnRH. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 152:432-439, 1976.
- 90.- Patanelli, D.J. Discussion: physiology and antifertility effects of LHRH and analogs in males animals. In *LHRH as female and male contraceptives*, editado por G. Zatuchni, D. Shelton, J.J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp. 291-293.
- 91.- Faure, N., A. Lemaire, A. Bédangier, F. Labrie. Inhibition of androgen biosynthesis in the human male by chronic administration of (D-Ser(TBU)⁶, desGlyNH₂)LHRH ethylamide (buserelin). In *LHRH peptides as female and male contraceptives*, editado por G. Zatuchni, D. Shelton, J.J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp. 307-320.
- 92.- Rabin, D., R. Linde, G. Doelle, N. Alexander. Experience with a potent gonadotropin releasing hormone in normal men:

- an approach to the development of a male contraceptive. En LHRH peptides as female and male contraceptives, editado por G.Zatuchni, D.Shelton, J.J.Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. Pp. 296-306.
- 93.- Haush, A.J., G.F.Erickson. Extrapituitary inhibition of testicular function by LHRH. Nature 281:66-67, 1979.
- 94.- Metzker, C.E.. Discussion: Studies of LHRH analogs in the human male. En LHRH peptides as female and male contraceptives, editado por G.Zatuchni, D.Shelton, J.J.Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp.334-336.
- 95.- Schally, A.V., A.Arimura, D.H.Coy. Recent approaches to fertility control based on derivatives of LHRH. Vitam. Horm. 38:257-323, 1980.
- 96.- Vilchez-Martinez, J.A., A.Arimura, A.V.Schally, De la Cruz A., D.H.Coy. Blockade of ovulation in rats by inhibitory analogs of LHRH. Science 191:195-197, 1976.
- 97.- Schally, A.V. Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. Its implications for the control of reproductive processes. Science 202:18-28, 1978.
- 98.- Rivier, C., W.Vale. Temporal relationship between the abortifacient effects of GnRH antagonists and hormonal secretion. Biol.Reprod. 24:1061-1067, 1981.
- 99.- Pineda, J.L., B.C.Lee, B.E.Spiliotis, W.Vale, J.Rivier, T.J.

Brown, B.B. Bercu. Effect of GnRH antagonist, (Ac- Δ^3 Prol, p-F-D-Phe², D-Trp^{3,6})GnRH, on pulsatile gonadotropin secretion in the castrate male primate. J.Clin.Endocrinol. Metab 56:420-422, 1983.

100.- Rivier, C., J. Rivier, W. Vale. Antireproductive effects of a potent gonadotropin releasing hormone antagonist in the male rat. Science 210:93-95, 1980.

101.- Rivier, J., C. Rivier, W. Vale. Antireproductive effect of a potent antagonist in the female rat. Endocrinology 108:1425-1430, 1981.

102.- Nekola, M.V., A. Horvath, L.J. Ge, D.H. Coy, A.V. Schally. Suppression of ovulation in the rat by an oral active antagonist of luteinizing hormone releasing hormone. Science 218:150-152, 1982.

103.- Heber, D., R. Dodson, R.S. Swerdloff. Pituitary receptor site blockade by a gonadotropin releasing hormone antagonist in vivo: mechanism of action. Science 216:420-421, 1982.

104.- Razan, A.K., B.S. Fang, B.H. Ritch, H. Britton, R.L. Rosenfield. Gonadotropin releasing hormone infusion test in the distinction of hypopituitary patients for normal subjects. Fertil. Steril. 31:507-512, 1979.

105.- Giustina, G., L. Trojasi, E. Reschini, A. Attanasio, A. D'alberton,

- G.C.Lombroso, M.Peracci, P.G.Crosignani. Prolactin, LH and FSH response to a combined TRH/LHRH test in amenorrheic women. En Hypothalamic Hormones, editado por M.Motta, P. Crosignani, M.Martini. Academic Press, 1975, pp.303-309.
- 106.- Wilson, E.A., M.J.Jawad. LHRH suppression of human placental progesterone production. Fertil.Steril. 33:91-93, 1980.
- 107.- Schiff, I., E.Wilson, R.Newton, J.Shain, R.Keits, K.J.Rayan, F.Naftolin. Serum LH, FSH and testosterone responses to Gnrf in males with varicoceles. Fertil.Steril. 27:1059-1061, 1976.
- 108.- Hudson, R.W., D.E.McKey. The gonadotropin response of men with varicoceles to gonadotropin releasing hormone. Fertil.Steril. 33:427-432, 1980.
- 109.- Franchimont, P., J.J.Legros. Modification of LHRH response under the influence of endocrine equilibrium. En Hypothalamic Hormones, editado por M.Motta, P.Crosignani, L. Martini. Academic Press, 1975. pp. 311-325.
- 110.- Silder-Khodr, T.M., G.S.Khodr. Extrahypothalamic luteinizing hormone releasing factor(LRF) release of immunoreactive LRF in vitro. Fertil.Steril. 32:294-296, 1979.
- 111.- Vazquez, J.M., J.O.Ellegood, S.J.Nazian, V.B.Mahesh. Effect of hyperprolactinemia on pituitary sensitivity to LHRH

following manipulation of sex steroids. *Fertil.Steril.* 33:543-549, 1980.

112.- Del Carmen Diaz, M., E. Murita, S. Goijman, V. Retton, R. Romaniello, L. Dabeljouc. Pituitary response to luteinizing hormone releasing hormone during haloperidol induced hyperprolactinemia. *Fertil.Steril.* 35:626-628, 1981.

113.- Khodr, G., T.M. Siller-Khodr. The effect of LHRH on human chorionic gonadotropin secretion. *Fertil. Steril.* 30:301-304, 1978.

114.- Happ, J., P. Shultz, T. Weber, U. Kordes, P. Shan, M. Neubauer, J. Boyer. Gonadotropin secretion in eugonadotropic human males and postmenopausal female under long term application of a potent analog of gonadotropin releasing hormone. *Fertil.Steril.* 30:674-678, 1978.

115.- Crowley, W.F. Jr., W.W. Vale, J. Rivier, J. McArthur. LHRH in hypogonadotropic hypogonadism. In *LHRH peptides as female and male contraceptives*, editado por G. Zatuchni, D. Shelton, J.J. Sciarra. Harper and Row publishers, 1981. pp. 321-333.

116.- Mortimer, C.H., G.M. Besser, A.S. McNeilly. Gonadotropin releasing hormone therapy in the induction of puberty, precocity, spermatogenesis and ovulation in patients with hypothalamic-pituitary-gonadal dysfunction. In *Hypoth*

lamic Hormones, editado por M.Motta, G.Crosignani, L.Martini. Academic Press, 1975. pp.325-335.

- 117.- Happ, J., U.Hartman, E.Weber, U.Kordes, J.Belyer. Gonadotropin and testosterone secretion in normal human males after stimulation with gonadotropin releasing hormone (GnRH) or potent GnRH analogs using different modes of application. *Fertil.Steril.* 30:666-673, 1978.
- 118.- Lamberts, S.W.J., M.Timmers, P.H.Dejong. The effect of long term naloxone infusion on the response of gonadotropin to LHRH and on plasma estradiol concentration in a patient with a prolactin secretion pituitary adenoma. *Fertil.Steril.* 36:678-681, 1981.
- 119.- Zárate, A., E.S?Canales, J.Soria, G.Forsbach, A.J.Kastin, A.V.Schally. Therapeutic use of gonadoliberin (follicle stimulating hormone/luteinizing hormone releasing hormone) in women. *Fertil.Steril.* 27:1233-1239, 1976.
- 120.- Nillius, J., L.Wide. Gonadotropin releasing treatment for induction of follicular maturation and ovulation in amenorrheic women with anorexia nervosa. *Br.Med.J.* 3:405-408, 1975.
- 121.- Zanartu, J., A.Dabancens, A.J.Kastin, A.V.Schally. Effect of synthetic hypothalamic releasing hormone (FSH/LHRH) in anovulatory sterility. *Fertil.Steril.* 25:160-169m 1974.

- 122.- Sheehan, K.L., S.S.C. Yen. Activation of gonadotropic function by an agonist of luteinizing hormone releasing hormone in the puerperium. *Am.J.Obstet,Gynecol.* 135:755-758, 1979.
- 123.- Sheehan, K.L., R.F. Casper, S.S.C. Yen. Effects of superactive agonist on gonadotropin and ovarian function during the menstrual cycle. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 135:759-764, 1979.
- 124.- Crowley, W.F., J.W. McArthur. Simulation of the normal menstrual cycle in Kallmans syndrome by pulsatile administration of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51:173-175, 1980.
- 125.- Leyendeker, G., L. Wildt, M. Hansmann. Pregnancy following chronic intermittent (pulsatile) administration of GnRH by means of a portable pump (zyklomat): a new approach in the treatment of infertility in hypothalamic amenorrhea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51:1214-1216, 1980.
- 126.- Shumaker, J., A.H.M. Simons, G.J.C. Vanosnabrugge, C. Lugtenburg, H. VanKessel. Pregnancy after prolonged pulsatile administration of luteinizing hormone releasing hormone in a patient with clomiphene resistant secondary amenorrhea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52:882-885, 1981.
- 127.- Raid, R.L., G.L. Leopold, S.S.C. Yen. Induction of ovulation

- and pregnancy with a pulsatile luteinizing hormone releasing hormone: dosage and mode of delivery. *Fertil. Steril.* 36:553-559, 1981.
- 128.- Knobil, E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.* 36:53-88, 1980.
- 129.- Patrinos, M.L., M. Amapleton, C. Panitza-Pafli, S. Pitoulis. Results of three time per week-long term administration of a luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) analog D-Ser(TBU)⁶ in primary amenorrhea. *Fertil. Steril.* 35: 515-520, 1983.
- 130.- Scarin, G., S.J. Nillius, L. Wide. Pulsatile subcutaneous low dose gonadotropin releasing hormone treatment of anovulatory (amenorrhea) infertility. *Fertil. Steril.* 40:454-460, 1983.
- 131.- Kastorke, T., D. Propping, M. Bonderhoe, P.F. Taubert. Clinical evaluation of the effects of a new long superactive LHRH analog: D-Ser(TBU)⁶ desGly-ethylamide-LHRH in women with secondary amenorrhea. *Fertil. Steril.* 33:35-42, 1980.
- 132.- Ganazzani, A.R., F.F. Hi, B. Deleo, E. Picciolini, F. Franchi, D. Parrini, P.M. Kicovic. Effect of epimestrol on gonadotropin and prolactin plasma levels and response to luteinizing hormone releasing hormone/thyrotropin releasing hormone in secondary amenorrhea and oligomenorrhea. *Fertil. Steril.*

30:654-660, 1978.

- 133.- Henderson, S.R., J. Bonnar, A. Moore, P.C.B. Mckinon. LHRH for induction of follicular maturation and ovulation in women with infertility and amenorrhea. *Fertil.Steril.* 27: 621-627, 1976.
- 134.- Haung, Ko-en. The induction of ovulation in amenorrheic women with synthetic LHRH: the significance of pituitary responsiveness. *Fertil.Steril.* 27:65-71, 1976.
- 135.- Dmowski, W.P., S. Headley, E. Radwanska. Effects of danazol on pulsatile gonadotropin patterns and on serum estradiol levels in normally cycling women. *Fertil.Steril.* 39: 49-55, 1983.
- 136.- Meldrum, D.R., R.J. Chang, J. Lu, W. Vale, J. Rivier, H.L. Judd. Medical oophorectomy using a long acting GnRH agonist - a possible new approach to the treatment of endometriosis. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 54:1081-1083, 1982.
- 137.- Lemay, A., G. Quesnel. Potent new treatment of endometriosis: reversible administration of LHRH agonist. *Fertil.Steril.* 38:376-379, 1982.
- 138.- Aono, T., T. Shioji, M. Kohono, G. Ueda, K. Kurachi. Pregnancy following 2-Bromo-alfaergocriptine (cb-154) induced ovulation in an acromegalic patient with galactorrhea and amenorrhea. *Fertil.Steril.* 27:341-344, 1976.

- 139.- Johnson, E.S., J.H. Seeli, W.F. Widd, E.R. Desombre. Endocrine dependent rat mamary tumor regression: use of a gonadotropin releasing hormone analog. Science 194:329-330, 1976.
- 140.- Klijn, J.G.M., F.H. Dejong. Treatment with a luteinizing hormone releasing hormone analogue (buserelin) in premenopausal patients with metastatic breast cancer. Lancet 1:1213-1216, 1982.
- 141.- Casper, R.F., G.F. Erickson, R.W. Revar, S.S.C. Yen. The effect of luteinizing hormone releasing hormone and its agonist on cultured human granulosa cells. Fertil. Steril. 37:406-409, 1982.
- 142.- Tureck, R.W., L. Mastroianni Jr., L. Bhascá, G.F. Strauss III. Inhibition of human granulosa cells progesterone secretion by a gonadotropin releasing hormone agonist. J. Clin. Endocrinol. Metab. 54:1078-1080, 1982.
- 143.- Lamberts, F.W.J., J.M. Timmers, R. Oosterom, T. Verleun, F.G. Romerts, F.H. Dejong. Testosterone secretion by cultured arrhenoblastoma cells: suppression by a luteinizing hormone releasing hormone agonist. J. Clin. Endocrinol. Metab. 54:450-454, 1982.
- 144.- Laron, Z, Z. Divkerman, Z. Benziv, A.V. Schally, R. Fraguer-Levin, A.M. Comarce-Schally. Long term effect of D-Trp⁶ LHRH

on testicular size and LH, FSH and testosterone levels in hypothalamic hypogonadotropic males. Fertil. Steril. 35:328-331, 1981.

145.- Dickerman, Z., R. Fragner-Lewin, Z. Laron, The effect of repeated injections of synthetic luteinizing hormone releasing hormone on the response of plasma LH and FSH in young and hypogonadotropic hypogonadal patients. Fertil. Steril. 27:162-166, 1976.

146.- Rozados, R., A. Dujoune, C. Lebas, N. Aparicio, D. H. Coy, A. V. Schally, A. Guitelman, A. Mancini, C. Vanzar. Correlation between LH responses to LHRH and to D-Leu⁶-LHRH ethylamide in patients with hypothalamic pituitary disease. Fertil. Steril. 27:1154-1157, 1976.

147.- Hashimoto, Takuma. Failure of combined therapy with synthetic LHRH and clomiphene citrate in patients with hypothalamic hypogonadism. Fertil. Steril. 35:84-85, 1981.

148.- Mortimer, C. H., A. S. McNeilly, F. A. Murray, R. A. Fisher, G. M. Besser. Gonadotropin releasing hormone therapy in hypogonadal males with hypothalamic or pituitary dysfunction. Br. Med. J. 4:617-619, 1974.

149.- Cano Iglesia, F., A. Fernández-Cruz, D. H. Coy, A. V. Schally, C. J. Jaramillo, A. L. Charro, V. Perez Infante, E. B. Obanza. Clinical studies with D-Trp⁶ LHRH in men with hypogonado-

- tropic hypogonadism. *Fertil.Steril.* 30:430-435, 1978.
- 150.- Kovacs, K.H., L. Sheenan. Pituitary changes in Kallmans syndrome: a histologic immunocytologic, ultrastructural and immunoelectron microscopy study. *Fertil.Steril.* 37: 83-89, 1982.
- 151.- Crowley, W.F. Jr, B.Z. Beitins, W. Vale, B. Kliman, J. Rivier, C. Rivier, J.W. McArthur. The biologic activity of a potent analogue of gonadotropin releasing hormone in normal and hypogonadotropic men. *New England Journal of Medicine* 302:1052-1057, 1980.
- 152.- Moore, M.P., R. Smith, R.A. Donald, E.A. Espiner, S. Stronach. The effect of different dose regimens of D-Ser(TBU)⁶LHRH-EA (HOE 766) in subjects with hypogonadotropic hypogonadism, *Clin. Endocrinol(Oxf)*. 14:93-98, 1981.
- 153.- Rabin, D., L.W. McNeil. Long term therapy with luteinizing hormone releasing hormone in isolated gonadotropin deficiency: failure of therapeutic response. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 52:557-561, 1981.
- 154.- Morel, Y., M. Fournier, B. Mazenod, J. Tourniare, R. Mornex. Treatment of hypogonadotropic hypogonadal male patients with luteinizing hormone releasing hormone (LHRH analog D-Ser(TBU)⁶EA¹⁰LHRH: transient disappearance of gonadotropin stimulation. *Fertil.Steril.* 38:85-91, 1982.

- 155.- Jacobson, R.I., L.E. Seyeker, W.V. Tamborlane, J.M. Gertner, M. Genel. Pulsatile subcutaneous nocturnal administration of GnRH by portable infusion pump in hypogonadotropic hypogonadism: initiation of gonadotropin responsiveness. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 49:652-657, 1979.
- 156.- Valk, T.W., K.P. Corely, R.P. Kelch, T.C. Marshall. Hypogonadotropic hypogonadism: hormonal response to low dose pulsatile administration of gonadotropin releasing hormone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 51:730-738, 1980.
- 157.- Skarin, G., S.J. Millius, L. Wibell, L. Wide. Chronic pulsatile low dose GnRH therapy for induction of testosterone production and spermatogenesis in a man with secondary hypogonadotropic hypogonadism. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 55:723-726, 1982.
- 158.- Hoffman, A.R., W.F. Crowley. Induction of puberty in men by long term pulsatile administration of low dose gonadotropin releasing hormone. *N.Engl.J.Med.* 307:1237-1241, 1982.
- 159.- Soules, M.R., C.B. Hammond. Female Kallmans syndrome: evidence for a hypothalamic LHRH deficiency. *Fertil.Steril.* 33:82-85, 1980.
- 160.- Happ, J., F. Kollman, C. Krawehl, M. Neubauer, U. Krause, K. Demish, J. Sandow, W. VonRechenberg, J. Beyer. Treatment of cryptorchid

dism with pernasal gonadotropin releasing hormone therapy. *Fertil.Steril.* 29:546-549, 1978.

161.- Keogh,E.J.,A.S.Mallal,P.F.H.Giles,D.V.Evans, Ovulation induction with intermitent subcutaneous LHRH. *Lancet* 1: 147-149, 1981.

162.- Illig,R.,T.Torresani,H.Bucher,M.Zachman,A.Prader, Effect of intranasal LHRH therapy on plasma LH,FSH and testosterone and relation to clinical results in prepubertal boys with cryptorchidism. *Clin. Endocrinol(Oxf)*. 12:91-94, 1980.

163.- Aparicio,N.J.,D.Turner,E.A.Turner,L.Schwartzstein. Response of LH and FSH to different doses of synthetic LHRH by intramuscular administration in normal and oligospermic men: preliminar report. *Fertil.Steril.*26:337-339, 1975.

164.- L.Schwartzstein,D.H.Coy,D.Turner,E.A.Turner,N.J.Aparicio, A.V.Schally, Response of LH and FSH to different doses of Δ -Leucine-6-LHRH ethylamide in oligospermic patients. *Fertil.Steril.* 27:545-548, 1976.

165.- Turner,E.,D.Turner,R.Mancini,N.J.Aparicio,L.Schwartzstein, A.V.Schally. Treatment of idiopathic normogonadotropic oligoastensperma with synthetic LHRH. *Fertil.Steril.* 27:549-555, 1976.

- 166.- Faure, N., F. Labrie, A. Lemay, A. Belanger, Y. Gourdeau, B. Laroche, G. Robert. Inhibition of serum androgen levels by chronic intranasal and subcutaneous administration of a potent luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) agonist in adult men. *Fertil. Steril.* 37:416-424, 1982.
- 167.- Borgman, V., W. Hardt, M. Schmidt-Gollwitzer, H. Adenauer, R. Nagel. Sustained suppression of testosterone production by luteinizing hormone releasing hormone agonist busarelin in patients with advanced prostate carcinoma. *Lancet* 1: 1097-1099, 1982.
- 168.- Tolis, G., D. Ackman, A. Stellos, A. Matha, F. Labrie, A. T. A. Fazekas, A. M. Comaru-Schally, A. V. Schally. Tumor growth inhibition in patients with prostatic carcinoma treated with luteinizing hormone releasing hormone agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:1658-1660, 1982.
- 169.- Geller, J., J. Albert, S. S. C. Yen, S. Geller, D. Loza. Medical castration of males with megestrol acetate and small doses of diethylstilbestrol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52: 576-579, 1981.
- 170.- Allen, M. J., J. P. O'shea, K. Mashiter, G. Williams, S. R. Bloom. Advanced carcinoma of the prostate: treatment with a gonadotropin releasing hormone agonist. *Br. M. J.* 286:1607-1609, 1983.

- 171.- Jakacki, R.I., R.P. Kelch, E.S. Saunders, J.S. Loyd, N.J. Hopwood, J.C. Marshall. Pulsatile secretion of luteinizing hormone in children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55:453-456, 1982.
- 172.- Wildt, L., G. Marsgall, E. Knobil. Experimental induction of puberty in infantile female rhesus monkey. *Science* 207: 1373-1377, 1980.
- 173.- Bergquist, C., S.J. Nillius, L. Wide. Effects of a luteinizing hormone releasing hormone agonist on luteal function in women. *Contraception* 22:287-290, 1980.
- 174.- Boyar, R.M., J.W. Finkelstein, R. David, H. Roffwarg, S. Kaplan, E.D. Weitzman, L. Hellman. Twenty four hour patterns of plasma luteinizing hormone in sexual precocity. *N. Engl. J. Med.* 289:282-285, 1973.
- 175.- Crowley, W.F., F. Comite, W. Vale, J. Rivier, D.L. Loriaux, G.B. Cutler. Therapeutic use of pituitary desensitization with a long acting analogue of luteinizing hormone releasing hormone: a potential new treatment for idiopathic precocious puberty. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52:370-374, 1980.
- 176.- Comite, F., G.B. Cutler, J. Rivier, W. Vale, D.L. Loriaux, W.F. Crowley. Short term treatment of idiopathic precocious puberty with a long acting analogue of luteinizing hormone releasing hormone. *N. Engl. J. Med.* 305:1546-1548, 1981.
- 177.- Stivel, H.S., R. Kauli, H. Kauffman, Z. Laron. Adrenocortical

functions in children with precocious sexual development during treatment with cyproterone acetate. Clin. Endocrinol. 16:163-164, 1982.