

Casos Clínicos

Calidad embrionaria tras la criopreservación según protocolo de estimulación. Uso de GnRHp. Caso clínico

Pulsatile GnRH added to gonadotrophins for controlled ovarian stimulation improves embryo quality after cryopreservation. Case report

Graña Barcia, M, Iglesias Fungueiro, MJ, Pallas Seijas, M.

Zygos, Centro Gallego de Reproducción, Santiago de Compostela.
Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela. España

Resumen

Objetivo: *Evaluar el efecto de la administración pulsátil de la GnRH durante la estimulación ovárica en la calidad de los pre-embriones criopreservados tras la descongelación.*

Diseño: *Describe la tasa de supervivencia de pre-embriones tras la descongelación y de número de células por embrión tras dicho proceso.*

Caso clínico: *Mujer sometida a cinco ciclos de fecundación con microinyección intracitoplasmática.*

Intervenciones: *Los pre-embriones obtenidos de ciclos ICSI se congelaron y descongelaron para posteriores transferencias.*

Resultados de medidas principales: *La tasa de supervivencia de pre-embriones tras la descongelación y número de células perdidas por pre-embrión en los ciclos con y sin GnRHp.*

Resultados: *De los 23 embriones descongelados procedentes de los ciclos estimulados con pauta estándar, 17 sufrieron un proceso de lisis o degeneración (73,91%), los 6 restantes presentaron pérdida de células (100%) y grado embrionario el 50%. Los embriones provenientes del ciclo con GnRHp mantuvieron el grado embrionario (100%) y uno tuvo pérdida de celularidad (25%).*

Conclusiones: *La administración pulsátil de GnRH podría mejorar la tasa de supervivencia de pre-embriones criopreservados tras el proceso de descongelación, resultando ser un factor positivo en la calidad embrionaria.*

Palabras clave: GnRH. Criopreservación de pre-embriones. Calidad embrionaria. ICSI.

Summary

Objective: *To determine the effect of the administration of pulsatile GnRH during ovarian stimulation on embryo quality after cryopreservation.*

Correspondencia: Prof. Dra. María Graña Barcia
ZYGOS. Centro Gallego de Reproducción
Avda. de las Burgas nº 2
15705 Santiago de Compostela. España
mariagranabarcia@zygos.es

Study design: *To determine the survival rate of embryos and the number of cells per embryo after thawing.*

Case report: *Woman subjected to five ICSI cycles.*

Interventions: *The embryos obtained were thawed for transfer.*

Main outcome measures: *Embryo survival rate and number of cells lost after thawing in cycles with or without pulsatile GnRH.*

Results: *Of the 23 embryos thawed from cycles using the standard stimulation protocol, in 17 there was cell degeneration and lysis (73.91%), and the remaining 6 had cell loss (100%) and 50% showed a decrease in embryo grade. In sharp contrast, embryos from cycles using pulsatile GnRH maintains embryo grade (100%) and there was cell loss in only one embryo (25%).*

Conclusions: *Administration of pulsatile GnRH could be used to improve embryo survival rate and quality after cryopreservation.*

Key words: GnRH. Embryo cryopreservation. Embryo quality. ICSI.

INTRODUCCIÓN

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido hipotalámico que desempeña una función trascendental en el ciclo reproductivo. En humanos se han identificado dos formas, llamadas GnRH-I y GnRH II, codificadas por genes diferentes (1,2). La GnRH tipo I se sintetiza en el hipotálamo medio basal y área preóptica del hipotálamo anterior está codificado por un único gen localizado en el cromosoma 8p11.2-p21. Aunque estas hormonas comparten cDNA y estructuras genómicas comparables, su distribución tisular y la regulación de la expresión genética es significativamente diferente. Su secreción es pulsátil (3) vía circulación portal, alcanza la hipófisis anterior donde se une a un receptor específico y ejerce su acción sobre el gonadotropo para la síntesis y liberación de FSH y LH (4) hormonas necesarias para el desarrollo folicular, la esteroidogénesis y espermatogénesis. Es sabido que esta hormona desempeña una función trascendental en el ciclo reproductivo. Las variaciones en el ritmo de secreción, son imprescindibles para determinar el tipo de subunidad de gonadotropina que debe sintetizarse.

La GnRH tipo II, se sintetiza en el cerebro medio y se diferencia de la tipo I en tres aminoácidos de las posiciones 5, 7 y 8 (5, 6), el gen codificador está situado en el cromosoma 20p13 y su acción es básicamente extrahipofisaria.

Ambas formas se distribuyen por diferentes órganos y tejidos ejerciendo acciones endocrinas a nivel hipofisario y autocrinas / paracrinas en compartimentos extrahipofisarios. La GnRH I se encuentra en niveles más elevados a nivel central mientras la GnRHII se ex-

presa en mayor medida en tejidos extrahipofisarios (6). El efecto biológico de GnRH I y GnRH II está mediado por el receptor para la GnRH I, codificado por el gen 4q21.2 (7) pues no se ha demostrado, por el momento, que exista un receptor específico para la GnRH II en humanos. Estudios experimentales demostraron que la acción de la GnRH no está limitada a su modulación en la síntesis de hormonas. Hace varios años se detectó la expresión de receptores de GnRH, así como la producción de este decapeptido, en órganos extrahipofisarios como el ovario (ovocito) (8-10), endometrio (11), miometrio (12) testículos (espermatozoides) (13, 14), placenta (15,16). La GnRH extrahipofisaria es inmunológica, biológica y químicamente idéntica a la GnRH hipotalámica (17). Por otra parte, se ha divulgado la expresión del mRNA y de la proteína de GnRH inmunoreactiva y de su receptor en el embrión humano preimplantacional y en el endometrio en todas las fases del ciclo como en el oviducto en la fase lútea, indicando la importancia de GnRH en la implantación (18, 19).

Este hecho, junto con los datos observacionales de que tanto la GnRH nativa como los análogos agonistas de GnRH (GnRH_a) mejoran los resultados de fertilización in Vitro (20), hicieron sospechar un papel trascendental de la Gonadotropina hipotalámica en los mecanismos de implantación, bien a través de una adecuada preparación endometrial o bien por una mejora de la calidad embrionaria. En estudios realizados en nuestra clínica observamos diferencias estadísticamente significativas en el número de ovocitos recuperados y en el porcentaje de gestaciones administrando GnRH en los ciclos de ICSI.

El estudio retrospectivo de la calidad embrionaria

tras la descongelación de embriones procedentes de ciclos de FIV realizados a una misma paciente con diferentes pautas de estimulación, refuerza la posible implicación de la GnRH en la fertilización, calidad embrionaria y presumiblemente sobre la implantación. La escasa o nula pérdida de células, así como el mantenimiento del grado de maduración de los embriones del ciclo en el que se utilizó la GnRH pulsátil (GnRHp) como terapia adyuvante en la estimulación ovárica, frente a los obtenidos en los ciclos estándar, sugieren una acción directa de la GnRH sobre el proceso de maduración y fecundación del ovocito.

CASO CLÍNICO

Paciente de 38 años que consulta por esterilidad primaria de 9 años de evolución por factor tubárico. Se sometió a 5 ciclos de fecundación con microinyección intracitoplasmática (FIV-ICSI), en cuatro de ellos la estimulación se realizó mediante FSH recombinante, gonadotropinas urinarias y previa desensibilización hipofisiaria con análogos agonistas de la GnRH (GnRH-a) y en un ciclo se añadió a la pauta anterior, una inyección subcutánea de 14 µg de GnRH pulsátil en un pulso de 90 minutos por vía subcutánea.

En todos los ciclos se obtuvo una buena respuesta ovárica, valorada por el número de ovocitos, grado de maduración ovocitaria (MII) y niveles plasmáticos de estradiol así como la calidad embrionaria.

En la tabla 1 se expresa la pauta de estimulación ovárica, niveles de estradiol obtenidos, número de

ovocitos totales y en metafase II, ovocitos fecundados y número de embriones congelados, en cada uno de los ciclos de FIV.

En cada ciclo se transfirieron tres embriones y los restantes que presentaban características morfológicas de viabilidad se criopreservaron. En el quinto ciclo de tratamiento se consiguió gestación de un feto con anencefalia que finalizó con interrupción voluntaria de embarazo.

Se realizaron tres ciclos (A, B, C) con 27 de los 36 embriones criopreservados, cuyos resultados se expresan en la Tabla 2.

Se analizaron los embriones criopreservados tras la descongelación, valorando la calidad embrionaria mediante el grado de maduración y número de células que presentaban el día de la transferencia.

Para el ciclo A se descongelaron cinco embriones procedentes del ciclo nº 1 de FIV, de los que dos no evolucionaron y en tres hubo pérdida de células del 75%, 33% y 66% respectivamente y uno de ellos presentó involución en la calidad en el momento de la transferencia. No se consiguió gestación.

Para el ciclo B de los seis embriones descongelados, procedentes del ciclo nº 1 de FIV, tres no evolucionaron y los restantes mostraron disminución en el número de células del 0%, 50% y 80% respectivamente y dos de ellos en la calidad embrionaria. No hubo gestación.

En el ciclo C se descongelaron seis embriones procedentes del ciclo nº 2 y seis del nº 3 que no evolucionaron. Posteriormente cuatro embriones del ciclo 4º, en el que se utilizó la GnRHp mantuvieron el grado

Tabla 1
Resultados de 5 ciclos de FIV realizados en ZYGOS

Nº Ciclo	Tratamiento	E2 pg/mL	Nºovocitos/Metafase II	Fecundados	Congelación
1	FSH-r 1125 UI HMG 125 UI GnRH-a	5.617	20/17	15	11
2	FSH-r 1700 UI HMG 525 UI GnRH-a	5.862	22/21	9	6
3	FSH-r 2100 UI HMG 225 UI GnRH-a	4.116	21/16	11	6
4	FSH-r 2100 UI GnRHp (20 µg/pulse) GnRH-a	2042	14/9	8	4
5	FSH-r 2650 UI GnRH-a	2692	29/23	15	7

Tabla 2

Resultado de la descongelación de embriones

Nº Ciclo	Ciclo origen (nº de embriones)	Estadio Pre-	Estadio Post-	Transfer
A	1 (5)	4-2	Deg	-
		4-2	1-2	1-2
		3-2	2-2	2-2
		3-1	Deg	-
		3-1	1-1	1-3
B	1(6)	4-2	4-2	5-3
		4-2	2-2	3-3
		5-3	1-3	2-3
		4-3	Deg	-
		4-1	Deg	-
C	2(6)	4-2	Deg	NO
		6-2	Deg	NO
		5-2	Deg	NO
		5-2	Deg	NO
		8-2	2-2	NO*
		6-2	2-2	NO*
	3(6)	4-1	Deg	NO
		4-1	Deg	NO
		4-2	Deg	NO
		4-3	Lisado	NO
		6-3	Lisado	NO
	4(4)	6-1	6-1	6-1
		4-2	4-2	4-2
8-2		5-2	5-2	
6-2		6-2	6-2	

embrionario previo a la criopreservación, con una pérdida celular del 0%, 0%, 62% y 0% respectivamente, evolución que se mantuvo hasta la transferencia.

De los 23 embriones descongelados procedentes de los ciclos estimulados con pauta estándar, 17 sufrieron un proceso de lisis o degeneración (73,91%), los 6 restantes presentaron pérdida de células (100%) y grado embrionario el 50%. Los embriones provenientes del ciclo con GnRHp mantuvieron el grado embrionario (100%) y uno tuvo pérdida de celularidad (25%) (Tabla 3).

DISCUSIÓN

La GnRH desempeña un papel importante en la reproducción mamífera estimulando la síntesis y la

Tabla 3

Calidad embrionaria tras la descongelación

Ciclo origen	Total embriones descongelados	Pérdida de embriones	Pérdida de células importantes
1	11 / 11	5 / 11	6 / 11
2	6 / 6	4 / 6	2 / 6
3	6 / 6	6 / 6	6 / 6
4	4 / 4	0 / 4	1 / 4

secreción de gonadotropinas mediante su unión a los receptores de GnRH (GnRHRs) en los gonadotropos pituitarios. Además de este papel bien documentado, la GnRH tiene efectos directos sobre las gónadas. Se expresa en varios compartimientos del ovario incluyendo las células granulosas luteínicas, las células epiteliales superficiales ováricas y los tumores ováricos (21-24). Además se ha demostrado la expresión del ARNm de la GnRHI y de la proteína en el epitelio tubárico de la trompa de Falopio durante la fase luteal del ciclo reproductivo (25). Se ha encontrado que la GnRH modula la esteroidogénesis básica (26) e induce la transcripción de varios genes implicados en la maduración folicular y la ovulación (27, 28), expresada en niveles de estradiol adecuados, según los folículos desarrollados, como se demuestra en la tabla número 1 y en la calidad de los ovocitos. Además, la GnRH y sus análogos sintéticos tienen efectos inhibitorios del crecimiento directo en tumores sensibles a hormona, incluyendo los carcinomas del ovario, de mama, del endometrio, y de la próstata (29-32). Cabe pensar que la GnRH pueda actuar como factor importante en la regulación autocrina y paracrina de la función ovárica local (24). Sin embargo, hasta la fecha, los mecanismos moleculares en la regulación de la expresión del gen de GnRH (receptor de la GnRH) en el ovario humano siguen siendo mal entendidos.

En los ciclos de fecundación in vitro, el desarrollo de múltiples folículos, tiene unos requerimientos de GnRH I mayores que los que se precisan para el ciclo monofolicular fisiológico y esta hormona se encuentra incluso en concentraciones menores pues; el empleo de GnRH α reduce los niveles de mRNA de GnRH I (22), además los niveles elevados de estradiol, que se alcanzan en estos ciclos, tienen un efecto inhibitorio sobre la secreción de GnRH I a nivel central, y a nivel periférico suprimen la expresión de RNAm de GnRHI y del receptor para GnRH (33, 34). Por otro lado, en el compartimento ovárico, los estró-

genos incrementan los niveles de RNA m de GnRH II de una manera dependiente de la dosis y del tiempo (35). La GnRh II o sus análogos causan una regulación a la baja del RNAm de GnRHI en un amplio rango de concentraciones (22). Esta disminución de la concentración de la GnRHI causaría un incremento de la expresión del receptor de GnRH tanto a nivel pituitario como a nivel de las células de la granulosa o de la superficie del ovario (24).

Existen evidencias de que la GnRH segregada a nivel del oviducto durante la fase lútea puede contribuir a mejorar la calidad de los gametos y de embriones, y por ende la tasa de implantación. Sin embargo en los ciclos de FIV los ovocitos y embriones no están en contacto con los fluidos tubáricos, pudiendo suponer una disminución en la calidad embrionaria y en la tasa de implantación, explicando la causa de las gestaciones tan bajas en relación con el número de embriones que se consigue en el laboratorio.

En el caso presentado, los embriones obtenidos han demostrado un comportamiento desigual en cuanto a su calidad, respecto a su estadio previo a la criopreservación. El hecho de que los embriones pertenezcan a la misma pareja y provengan de ovocitos obtenidos de diferentes ciclos de FIV, con el mismo protocolo de estimulación en 3 de ellos y que solamente los embriones provenientes del ciclo en el que se utilizó GnRHp fueron los únicos que, tras la descongelación, han mantenido las características (numero de células y fase de maduración) a las previas, podría deberse a que la concentración de GnRH plasmática existente en el ciclo natural esta calculada para un ciclo monofolicular y por ello sería "insuficiente" para extender sus efectos biológicos a los ovocitos del ciclo multifolicular que caracteriza al ovario sometido a hiperestimulación controlada para tratamientos de FIV.

El suministro de GnRH exógena, en los ciclos multifoliculares resulta ser un aporte de ligando adicional que se uniría a sus receptores específicos, incrementados en la regulación a nivel de las células de la granulosa. Esta interacción desencadenaría la señalización intracelular correspondiente, probablemente a nivel de metabolismo fosfolipídico, estimulando la maduración del ovocito, conservando las células de la granulosa del folículo ovárico y predisponiendo así, al ovocito fecundado criopreservado a soportar mejor el proceso de descongelación, resultando ser un factor condicionante en el número y en la calidad de los embriones obtenidos tras un proceso de criopreservación. Las tres principales variables que demuestran la eficiencia de la criopreservación son la tasa de supervivencia de embriones, la tasa de implantación y la tasa de embarazos llegados a término. La calidad em-

brionaria tras el proceso de descongelación se aprecia en la tabla 3; se manifiesta por su resistencia al proceso de criopreservación-descongelación y por tanto en la supervivencia integral o parcial del embrión. Se han realizado diversos estudios del comportamiento de pre-embryones en estado de pronúcleo criopreservados obtenidos en ciclos de fertilización in vitro con o sin agonistas de GnRH y se ha observado que la utilización de agonistas no afecta a la calidad de los pre-embryones (36) presentando igual aptitud para el desarrollo después de la criopreservación (37), ni a la tasa de embarazos e implantación (38). Sin embargo, estudios recientes con blastocistos descongelados derivados de ciclos con agonistas de GnRH vs. antagonistas han demostrado que los primeros presentan una tasa mayor de supervivencia al proceso de congelación que los blastocistos obtenidos de ciclos con antagonistas de GnRH (39). Si el uso de GnRH pulsátil ayuda a una selección de pre-embryones con una mejor calidad, y siendo el éxito de la implantación dependiente de la calidad embrionaria y de la receptividad uterina, se podría considerar la administración exógena y continuada de esta hormona un factor selectivo positivo en el éxito de la implantación.

CONCLUSIONES

La administración pulsátil de GnRH exógena en ciclos de estimulación ovárica previo ICSI en la misma paciente parece mejorar la calidad de los pre-embryones criopreservados tras la descongelación, reflejado en una mayor tasa de supervivencia de los mismos y en una pérdida menor de células respecto a los ciclos sin tal suministro hormonal.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H.:** Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormone in avian species. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3874-3878.
2. **White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD.:** Second form of gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 305-309.
3. **Filicori M, Flamigni C, Campaniello E, Ferrari P, Meriggiola MC, Michelacci L, Pareschi A, Valdiserri A.:** Evidence for a specific role of GnRH pulse frequency in the control of the human menstrual cycle. *Am J Physiol* .1989; 257B(6 Pt 1): E930-6.

4. **Knobil, E.:** The neuroendocrine control of the human menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.* 1980; 36: 53-88.
5. **White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD.:** Second form of gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 305-309.
6. **Millar RP.:** GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 2003; 14: 35-43
7. **Leung PC, Squire J, Peng C, Fan N, Hayden MR, Olofsson JI.:** Mapping of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene to human chromosome 4q21.2 by fluorescence in situ hybridization. *Mamm Genome* 1995; 6: 309-310.
8. **Peng C, Fan NC, Ligier M, Vaananen J, Leung PC.:** Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology*, 1994; 135: 1740-1746.
9. **Casan EM, Raga F, Bonilla-Musoles F, Polan ML.:** Human oviduct gonadotropin-releasing hormone: possible implications in fertilization, early embryonic development, and implantation. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85: 1377-1380.
10. **Chou CS, Beristain AG, MacCalman CD, Leung PC.:** Cellular localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II in first-trimester human placenta and deciduas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89: 1459-1466.
11. **Pahwa GS, Kullander S, Vollmer G, et al.:** Specific low affinity binding sites for gonadotropin-releasing hormone in human endometrial carcinomata. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod.* 1991; *Biol.*, 41: 135-142.
12. **Chegini N, Rong H, Dou Q et al.:** Gonadotropin releasing hormone and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996; 81: 3215-3221.
13. **Ramakrishnappa N, Rajamahendran R, Lin YM, Leung PC.:** GnRH in non-hypothalamic reproductive tissues. *Anim. Reprod Sci.* 2005; 88 (1-2): 95-113.
14. **Bhasin S, Heber D, Peterson M, et al.:** Partial isolation and characterization of testicular GnRH-like factor. *Endocrinology*, 1983; 112: 1144-1146.
15. **Gibbons Jr, JM, Mitnick M and Chieffo V.:** In vitro biosynthesis of THS and LH releasing factors by the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1975; 121: 127-131.
16. **Khodr GS and Siler-Khodr TM.:** Placental LRF and its synthesis. *Science*. 1980; 207: 315-317.
17. **Imai A, Furui T and Tamaya T.:** Is extrapituitary action of gonadotropin releasing hormone biologically significant? *Ann. Clin. Biochem*, 1992; 29: 477-480.
18. **Casan EM, Raga F, Polan ML.:** GnRH mRNA and protein expression in human preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod*, 1999, Mar; 5(3): 234-9.
19. **Eleuterio R, Hernández.** Embryo implantation and GnRH antagonists Embryo implantation: the Rubicon for GnRH antagonists *Human Reproduction* 2000; Vol. 15, No. 6, 1211-1216.
20. **Tesarik J, Hazout A, Mendoza-Tesarik R, Mendoza N, Mendoza C.:** Beneficial effect of luteal-phase GnRH agonist administration on embryo implantation after ICSI in both GnRH agonist-and antagonist-treated ovarian stimulation cycles. *Hum Reprod.* 2006; 21(10): 2572-9.
21. **Choi KC, Auersperg N, Leung PC.:** Expression and antiproliferative effect of a second form of gonadotropin-releasing hormone in normal and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86: 5075-5078.
22. **Kang SK, Tai CJ, Nathwani PS, Leung PC.:** Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology*, 2001; 142: 182-192.
23. **Kang SK, Cheng KW, Nathwani PS, Choi KC, Leung PC.:** Autocrine role of gonadotropin-releasing hormone and its receptor in ovarian cancer cell growth. *Endocrine*. 2000; 13: 297-304.
24. **Kang SK, Choi KC, Cheng KW, Nathwani PS, Auersperg N, Leung PC.:** Role of gonadotropin-releasing hormone as an autocrine growth factor in human ovarian surface epithelium. *Endocrinology*, 2000; 141: 72-80.
25. **Casan EM, Raga F, Bonilla-Musoles F, Polan ML.:** Human oviduct gonadotropin-releasing hormone: possible implications in fertilization, early embryonic development, and implantation. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85: 1377-1380.
26. **Leung PC, Steele GL.:** Intracellular signaling in the gonads. *Endocr Rev* 1992; 13: 476-498.
27. **Ny T, Liu YX, Ohlsson M, Jones PB, Hsueh AJ.:** Regulation of tissue-type plasminogen activator activity and messenger RNA levels by gonadotropin-releasing hormone gene in cultured rat granulosa cells and cumulus-oocyte complexes. *J Biol Chem*, 1987; 262: 11790-11793.
28. **Wong WY, Richards JS.:** Induction of prostaglandin H synthase in rat preovulatory follicles by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 1992; 130: 3512-3521.
29. **Yano T, Pinski J, Radulovic S, Schally AV.:** Inhibition of human epithelial ovarian cancer cell growth in vitro by agonistic and antagonistic analogues of luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 1701-1705.
30. **Harris NC, Dutlow C, Eiden KA, Dong KW, Ro-**

- berts JL, Millar RP.:** Gonadotropin-releasing hormone gene expression in MDA-MB-231 and ZR-75-1 breast carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 1991; 51: 2577-2581.
31. **Emons G, Schroder B, Ortmann O, Westphalen W, Schulz KD, Schally AV.:** High affinity binding and direct antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone analogs in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993; 77: 1458-1464.
 32. **Qayum A, Gullick W, Clayton RC, Sikora K, Waxman J.:** The effects of gonadotropin-releasing hormone receptor analogues in prostate cancer cell are mediated through specific tumor receptor. *Br J Cancer*, 1990; 62: 96-99.
 33. **Nathwani PS, Kang SK, Cheng KW, Choi KC, Leung PC.:** Regulation of gonadotropin-releasing hormone and its receptor gene expression by 17 β -estradiol in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology*, 2000; 141: 1754-1763.
 34. **Kang SK, Tai CJ, Nathwani PS, Leung PC.:** Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal. *Endocrinology*, 2001 Jan; 142(1): 182-92.
 35. **Khosravi S, Leung PC.:** Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)I and GnRHII messenger ribonucleic acid by gonadal steroids in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 663-672.
 36. **Benshushan A, Ezra Y, Simon A, Mordel N, Lewin A, Laufer N.:** The effect of gonadotropin-releasing hormone agonist on embryo quality and pregnancy rate following cryopreservation. *Fertil Steril*. 1993 May; 59(5): 1065-9. Links.
 37. **Oehninger S, Toner JP, Veck LL, Brzyski RG, Acosta AA, Muasher SJ.:** Performance of cryopreserved pre-embryos obtained in in vitro fertilization cycles with or without a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril*. 1992 Mar; 57(3): 620-5.
 38. **Seelig AS, Al-Hasani S, Katalinic A, Schopper B, Sturm R, Dieck K, Ludwig M.:** Comparison of cryopreservation outcome with gonadotropin-releasing hormone agonists or antagonists in the collecting cycle. *Fertil Steril*. 2002 Mar; 77(3): 472-5.
 39. **Medved R, Virant-Klun I, Meden-Vrtovec H, Tomazevic T.:** Outcome of frozen-thawed blastocysts derived from gonadotropin releasing hormone agonist or antagonist cycles. *J Assist Reprod Genet*. 2006 Jun; 23(6): 275-9.