

## La neurohormona GnRH en la mujer

### Neurohormone GnRH in the woman

Alberto Romeu<sup>1</sup>. Mónica Romeu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ex-Jefe de Servicio de Ginecología y Reproducción Humana del Hospital U. La Fe

<sup>2</sup>Servicio de Ginecología y Reproducción. Hospital U. y P. La Fe

#### INTRODUCCIÓN

Se han cumplido 50 años desde que Hálasz y Pupp evidenciaron que el “área hipofisiotropa” totalmente liberada de aferencias nerviosas basta para mantener la función de la adenohipófisis. Sus investigaciones permitieron iniciar la búsqueda de lo que hoy conocemos como GnRH.

Desde entonces, los conocimientos adquiridos sobre las relaciones hipotálamo-hipofisarias relacionadas con la fertilidad y la reproducción humanas han revolucionado la medicina reproductiva.

A partir del presente número de la Revista Iberoamericana de Fertilidad, distintas actualizaciones resumirán el estado actual del conocimiento en relación con la GnRH. Estas actualizaciones se estructuran en distintos “capítulos”: 1) antecedentes históricos, 2) el sistema kisspeptina/GnRH, 3) relaciones GnRH/reserva energética y metabolismo y 4) Agonistas y antagonistas de GnRH.

Los responsables de la edición de esta revista esperamos que estas actualizaciones sean de utilidad para los ginecólogos dedicados a la medicina reproductiva.

#### ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La idea de que el cerebro está implicado en el control de las funciones hipofisarias se remonta a los años 30 del pasado siglo (1). En aquella época ya se conocían algunos fenómenos fisiológicos, como la ovulación refleja de la coneja como respuesta a la estimulación del cuello uterino, y patológicos, como determinados trastornos del ciclo de origen psicógeno, para los que no había explicación. En nuestro país, Marañón, por ejemplo, aludió a trastornos endocrinos desencadenados por el estrés y a la vinculación funcional de la glándulas endocrinas al sistema nervioso (2). Se admitía, pues, que algunas glándulas endocrinas se veían controladas o influenciadas por el sistema nervioso central.

Aceptado: 5/5/16

Correspondencia: Alberto Romeu

aromeu2000@hotmail.com

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

Sin embargo, no había una explicación fisiológica convincente debido al hecho de que la adenohipófisis, concebida por entonces como “el director de la orquesta endocrina” recibe tan solo una discreta inervación formada por escasas fibras nerviosas vasomotoras que inervan los vasos hipofisarios (3).

Para entonces, Popa y Fielding ya habían descrito el sistema porta hipotálamo-hipofisario (4) pero, en su descripción, confundieron la dirección del flujo sanguíneo, al describir su sentido: desde la hipófisis al hipotálamo y no al contrario, como establecieron más tarde Wislocky y King (5), citado por Malacara (6).

En 1936, Greep demostró que ratas hipofisectomizadas portadoras de injertos hipofisarios en la silla turca mostraban buena función adenohipofisaria, incluidos ciclo estral, embarazo y lactancia (7), citado por Schally (8). Estas relaciones neurohumorales hipotálamo-hipofisarias serían más tarde confirmadas por más completos estudios de Harris.

Efectivamente, fueron fundamentales las investigaciones de GW Harris, que estableció la teoría neurohumoral, según la cual el peculiar sistema de capilares existente entre el hipotálamo anterior y la hipófisis hace llegar a la misma sustancias de origen hipotalámico que actúan regulando todas y cada una de las secreciones adenohipofisarias (3, 9, 10).

La hipófisis anterior presenta una rica conexión vascular con la eminencia media en la forma de un sistema porta, descrito inicialmente por Popa y Fielding (4) y más tarde por Wislocky y King y por Green y Harris, en los que la sangre fluye, básicamente, desde la eminencia media hacia la hipófisis (3). Considerando la ya mencionada escasa inervación de la adenohipófisis, los conocimientos sobre la fisiología hipotálamo-hipofisaria dieron, al establecer Harris su teoría neuro-humoral, un importante paso: el sistema capilar existente entre el hipotálamo anterior y la adenohipófisis podía ser la vía por la que sustancias hipofisiotropas de origen hipotalámico, al alcanzar el parénquima de la glándula, podrían actuar como control de la liberación de las hormonas hipofisarias (3, 9, 11-14).

Aceptada esta teoría a partir de las mencionadas evidencias, los investigadores tenían el desafío de localizar, aislar, caracterizar y, si fuera posible, sintetizar los factores hipotalámicos de control adenohipofisario.

Estudios neuroanatómicos de desaferentación permitieron a Halasz y Pupp delimitar un área hipotalámica, que denominaron área hipofisiotropa, capaz de mantener la actividad de la adenohipófisis aún habiendo sido suprimidas todas sus fibras aferentes, siempre y cuando se mantuviera la integridad del tallo hipofisario (15). Además, estos mismos autores comprobaron que el trasplante de adenohipófisis en con-

tacto con el área hipofisiotropa permitía que la función adenohipofisaria se mantuviera (16).

Para entonces, había sido descrito que los axones de las neuronas cuyos somas se localizan en el área hipofisiotropa forman el haz hipotálamo-infundibular, que termina en íntima conexión con el sistema porta (17).

En las décadas de 1960 a 1970 y 1970 a 1980 se produjo una muy intensa búsqueda de los llamados “factores de liberación” hipotalámicos, tanto en el tejido hipotalámico como en extractos del mismo (18-22).

Guillemin y cols (23) demostraron en 1961 la presencia de un factor liberador de LH en extractos hipotalámicos ovinos y, poco después, lo caracterizaron parcialmente, evidenciando que se trataba de un péptido (24). Evidencias similares fueron puestas de manifiesto por Schally y su grupo (22).

En esa misma época se evidenció que la estimulación eléctrica del hipotálamo induce una descarga adenohipofisaria de gonadotrofinas (25), que la administración de LRF (LH releasing factor) purificado a animales anovuladores por destrucción hipotalámica induce la ovulación (26) y ya se conocía que lesiones electrolíticas del hipotálamo alteran la secreción de LH (27), citado por Schally y cols. (8).

Aunque inicialmente se consideró la existencia de dos factores de liberación, uno para FSH (28) y otro para LH (22), no pasó mucho tiempo hasta que fue evidenciado que una misma sustancia favorecía simultáneamente la secreción de ambas gonadotrofinas (29). Con el tiempo, esta acción biológica tendría como consecuencia que se conociera la neurohormona con la denominación GnRH, denominación que se mantiene actualmente.

Se demostró que la inyección de LRF (LRH, LHRH o GnRH) porcino, al que ya se le concedía la categoría de hormona pasando a ser conocido como LRH, a hombres y mujeres inducía la liberación de LH, lo que hacía pensar que no era específico de especie (30) y que, así mismo, era activo *in vitro* (29).

Estudios bioquímicos condujeron a la determinación de la estructura química completa de la neurohormona (31-33), lo que facilitó su síntesis (34), comprobándose la efectividad del producto sintetizado (35).

Este proceso valió a Andrew Schally y a Roger Guillemin el premio Nobel de medicina y fisiología del año 1977, debido a que sus dos equipos, de forma independiente consiguieron su caracterización y síntesis.

En años posteriores se evidenció que, si bien una forma de GnRH, denominada GnRH I (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) estimula la secreción de gonado-

trofinas, la mayor parte de vertebrados poseen alguna forma más de GnRH. Una de éstas, designada GnRH II (pGlu-His-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>), se conserva evolutivamente desde los peces a la especie humana y está ampliamente distribuida en el cerebro, lo que sugiere que participa en importantes funciones neuromoduladoras, como la excitación sexual (36). Numerosas especies animales presentan receptores específicos para las distintas formas de GnRH. Sin embargo, en la especie humana y en los chimpancés, entre otras especies, solo ha sido identificada una forma funcional de receptor, el tipo I, mientras que el tipo II ha sido genéticamente silenciado (37).

En la presente revisión no nos ocuparemos del sistema GnRH II-GnRH IIR puesto que no juega un papel conocido en la regulación del sistema hipofiso-gonadal de la mujer.

### LAS NEURONAS PRODUCTORAS DE GnRH

GnRH es el producto de síntesis y liberación de determinadas neuronas localizadas fundamentalmente en el hipotálamo, que son, genéricamente, células neurosecretoras: como las células glandulares epiteliales se agrupan y contienen un evidente sistema reticuloendoplásmico rugoso y de un sistema de Golgi bien desarrollado; contienen también gránulos de secreción contenidos en vesículas; como las células nerviosas contienen neurofibrillas y constan de dendritas y axones. Estos últimos no forman sinapsis con otras neuronas sino que terminan en el espacio pericapilar, donde liberan el producto de neurosecreción.

En su día fueron caracterizadas por métodos inmunohistoquímicos y radioinmunológicos (38, 39). Las neuronas productoras de GnRH no se agrupan en núcleos concretos sino distribuidas en un sistema de redes; no son muy abundantes, entre 1 000 y 3 000, localizadas en el núcleo arcuato y el área preóptica del hipotálamo anterior. Sus axones se proyectan fundamentalmente a la eminencia media donde contactan con el sistema porta donde liberan su producto de secreción; otros axones se proyectan al sistema límbico y al OVLT. En estas proyecciones actúan como neuromoduladores de la conducta reproductiva, del olfato y otras funciones (40).

Las neuronas periféricas del sistema olfatorio presentan una característica que la hace únicas: sus dendritas contactan directamente con el entorno exterior (41). El sistema olfatorio no solo es crítico para la detección de olores sino también para controlar y determinar determinadas conductas, entre otras la conducta reproductiva (42). El conocimiento de las relaciones entre sistema olfatorio y sistema reproductor es necesario para comprender la fisiología reproductiva de las especies, entre otras la humana, y determinadas patologías. Fue evidenciado que las neuronas GnRH-1 se originan en la placa olfatoria poco después que las neuronas sensoriales

olfatorias. El estímulo de FGF es necesario y suficiente para inducir la diferenciación de neuronas GnRH-1, mientras que el ácido retinoico reprime su formación (43).

Alteraciones en la formación o la migración de estas neuronas condicionan la aparición de hipogonadismo hipogonadotropo asociado a anosmia (síndrome de Kallmann) (44).

Investigaciones de Schwanzel-Fukuda y Pfaff pusieron de manifiesto que las neuronas que expresan GnRH se sitúan en el núcleo preóptico y en el hipotálamo (las localizaciones muestran variaciones entre distintas especies), desde donde controlan la síntesis y liberación de gonadotrofinas (45). Estas células se originan en la placa olfatoria (46, 47) y órgano vomeronasal (48), desde donde emigran, a través de la lamina cribiforme siguiendo el trayecto del nervio terminal, con el concurso de *neural cell adhesion molecules* (NCAM) (47, 49), un miembro de la familia de las inmunoglobulinas situado en los axones de los nervios terminal, olfatorio y vomeronasal (50), que juega un importante papel en el crecimiento y migración de los axones. De hecho, la inmunoneutralización de NCAM mediante la inyección de una pequeña cantidad de antisero a embriones de ratón de 10 días retrasa y disminuye la migración de las neuronas GnRH (51).

Ha sido experimentalmente evidenciado que GnRH estimula la formación de axones, reorganiza el citosqueleto de las neuronas olfatorias humanas productoras de GnRH y estimula la migración, postulándose que la GnRH producida por neuroblastos olfatorios actúa de forma autocrina promoviendo la diferenciación y migración de esas células cuyo destino es ser neuronas GnRH (52).

Han sido investigadas distintas sustancias que pueden actuar como factores quimiotácticos en la migración, utilizándose neuronas inmortalizadas que expresan GnRH (GN11); entre éstas, hepatocyte growth factor (HGS/SF), un factor paracrino de crecimiento y diferenciación, y vascular endotelial growth factor (VEGF) han mostrado inducir quimiotaxis específica sobre células GN11, lo que sugiere que señales migratorias llegan desde el mesénquima nasal (53). No obstante, este origen de las neuronas secretoras de GnRH ha sido discutido por algún investigador (54).

En resumen, la migración de las neuronas GnRH desde el placodo olfatorio hasta el hipotálamo es un complejo e incompletamente conocido fenómeno, indispensable y clave para el funcionamiento del sistema hipotálamo-hipofisogonadotropo. La ausencia de migración o la migración defectuosa da lugar a que se produzca un cuadro congénito de hipogonadismo hipogonadotropo y anosmia, que se ha conocido como síndrome de Maestre de San Juan, síndrome de De Morsier y síndrome de Kallman (55).

Independientemente del origen embrionario de las neuronas secretoras de GnRH, ha sido evidenciado que pueden generarse en hombres adultos a partir de células madre neurales localizadas en el hipotálamo en neuroesferas; estas células son la razón de que individuos que, por padecer hipogonadismo hipogonadotropo por déficit de GnRH, son tratados con la administración pulsátil de la neurohormona, puedan recuperar la función al suprimirse el tratamiento (56).

## SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE GnRH

La síntesis de GnRH se realiza en las neuronas específicas ya descritas, siendo codificado por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 8, 8p21 (57).

La estructura primaria de GnRH ovino fue establecida como pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>, que resultó ser idéntica a la ya conocida en porcino y activa, una vez sintetizado el péptido (34).

GnRH se sintetiza como pre-pro-GnRH, un péptido precursor de 92 aminoácidos que contiene: un péptido señal de 23 aminoácidos, el decapeptido (GnRH), una secuencia Glu-Lis-Arg (proteólisis y amidación) y un péptido de 56 aminoácidos denominado GnRH associated peptide (GAP) que ha mostrado inhibir *in vitro* la síntesis de prolactina (PRL) (58).

La determinación de los niveles de GnRH en sangre periférica es difícilmente viable, debido a la gran dilución que experimenta esta neurohormona en la circulación general. Por esta razón, la dinámica de la secreción de la misma ha sido estudiada a través de la secreción de LH, habiéndose centrado muchos informes en el carácter pulsátil de la misma (59).

La secreción de GnRH presenta algunas características que merecen ser analizadas con cierto detenimiento: la pulsatilidad y la inducción del pico preovulatorio de gonadotrofinas.

## PULSATILIDAD

La liberación pulsátil de GnRH en la eminencia media es el elemento esencial para el control de la función reproductora y depende de la actividad coordinada de las aproximadamente 2 000 neuronas localizadas en el hipotálamo, como confirmaron las investigaciones de Carmel y cols (60) y Knobil (61), entre otros.

Se suponía que los pulsos de LH se correspondían con liberaciones puntuales, pulsátiles, de GnRH, tipo de secreción o liberación de la neurohormona, aspecto fisiológico que fue evidenciado por distintos investigadores (60, 62).

Se planteó entonces un nuevo problema: el de dilucidar los mecanismos de control responsables de la pulsatilidad de la secreción de GnRH.

La secreción pulsátil de GnRH depende de la acción autocrina de la propia GnRH y sus receptores específicos localizados en las neuronas productoras y liberadoras de la neurohormona. No obstante, han sido descritos numerosos mecanismos reguladores.

Las neuronas GnRH no se concentran en un área concreta del hipotálamo sino que se distribuyen en el hipotálamo mediobasal (63) y regiones adyacentes (64), enviando proyecciones a eminencia media; a pesar de su distribución difusa están interconectadas formando una unidad funcional que se conoce con el apelativo de generador de pulsos u oscilador (61). Fue demostrado que las neuronas GnRH "per se" contienen los elementos básicos del oscilador hipotalámico, es decir los mecanismos causantes de los pulsos, fenómeno relacionado con el flujo de Ca<sup>++</sup> en la célula (65, 66). Ha sido propuesto que el óxido nítrico (NO), estimulando el NMDA (aspartato), juegue un papel importante en la sincronización que permite la existencia de pulsos (67).

Estudios experimentales con neuronas inmortalizadas han permitido desarrollar la hipótesis consistente en la unión del receptor de GnRH (GnRH-R) a distintos tipo de proteína G: a bajas concentraciones de GnRH su receptor se uniría a proteínas G estimuladoras (Gs), mientras que a concentraciones elevadas lo haría a proteínas G inhibitoras (Gi) (68). Mediante este mecanismo, los pulsos se generan y autolimitan, lo que basta para que la secreción de la neurohormona presente su carácter pulsátil.

La expresión de GnRH-R, la activación de las señales de Ca<sup>++</sup> dependiente de GnRH y la regulación autocrina de la liberación de GnRH son características de las neuronas GnRH ya en los fetos tempranos y podrían constituir un mecanismo para la expresión de genes y la secreción regulada de GnRH durante la migración neuronal en el embrión (69).

La actividad del oscilador hipotalámico es influenciada por numerosos factores, como endotelina, aspartato, opioides endógenos, impulsos  $\alpha$ -adrenérgicos, andrógenos y estrógenos. Por otra parte, ha sido propuesto que GnRH ejerce una acción inhibitora sobre su propia secreción (70), aunque el mecanismo no es bien conocido.

**La endotelina** es un péptido formado por 21 aminoácidos producido por las células endoteliales cuya acción fundamental es la vasoconstricción. Ha sido demostrada la presencia de receptores específicos en las neuronas productoras de GnRH (71) y que la activación de estos receptores estimula la producción de fosfato de inositol y la liberación de

GnRH (72): Parece indudable que la Endotelina juega un papel en la regulación de la secreción de GnRH.

**Glutamato** es el principal neurotransmisor estimulante en la corteza cerebral humana, actuando a través de receptores específicos del tipo de canales iónicos, así como del tipo de receptores asociados a proteínas G (73). Receptores de Glutamato han sido localizados en distintas regiones del hipotálamo y en la hipófisis (74). Ha sido señalada una importante densidad de conexiones glutamatérgicas a nivel de las dendritas de las células GnRH (75).

Han sido descritas relaciones funcionales entre la acción de glutamato y el efecto modulador de la GnRH de los esteroides (estradiol) (76, 77). De hecho, la colocalización de receptores alfa de estrógenos y receptores NMDA justifican la participación de glutamato en la estimulación de la liberación de GnRH, tanto en la modalidad pulsátil como en la descarga preovulatoria (78, 79).

**Péptidos opioides endógenos.** Fue experimentalmente demostrado que los péptidos opioides endógenos modulan a la baja ambas, amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH, al comprobarse que una perfusión de naloxona tiene como consecuencia un aumento de ambas características de los pulsos de LH (80). A su vez, la actividad opioidérgica hipotalámica se modifica en dependencia de los niveles de esteroides ováricos (81), en particular el incremento simultáneo de estradiol y progesterona característico de la fase lútea; el aumento simultáneo de estradiol y progesterona condiciona un aumento de la actividad opioidérgica del hipotálamo (82) que, a su vez, justifica el declive de los pulsos de LH que se observa en esta fase (83). Esta acción de los esteroides ováricos sobre la pulsatilidad de GnRH es determinante para la ciclicidad ovárica de la mujer adulta (84). En efecto, la elevación del ritmo de los pulsos de GnRH, situación que se observa en la fase folicular se traduce en un aumento de la relación LH/FSH liberada por la hipófisis mientras que una disminución de aquel ritmo, como se observa durante la fase lútea se traduce en un aumento de la secreción de FSH, con lo que la relación LH/FSH disminuye. Este aumento cíclico de FSH, que se observa en la transición lúteo-folicular, es el responsable de iniciar el crecimiento de una cohorte folicular que incluye al que debe llegar a ser el folículo dominante.

**Noradrenalina y dopamina** estimulan la secreción de GnRH; esta acción está mediada por la activación de los receptores  $\beta$  1-adrenérgico y D1-dopaminérgicos (85).

**El ácido  $\gamma$  amino butírico** (GABA), uno de los más importantes neurotransmisores en los mamíferos, juega un importante papel en la regulación de la excitabilidad de las neuronas GnRH, ejerciendo un papel inhibitorio de la pulsa-

tilidad en situaciones como el estrés (86, 87). Este papel regulador se juega merced a numerosas conexiones sinápticas axosomáticas entre neuronas gabaérgicas y neuronas GnRH (75).

Independientemente de la importancia de los estímulos extrínsecos a las propias neuronas para que la secreción pulsátil sea posible, la conexión entre unas y otras neuronas a través de sinapsis y de las uniones tipo GAP resulta estrictamente necesaria para que la liberación coordinada marque el ritmo pulsátil, lo que permite la máxima sensibilización de las células gonadotropas y la correcta síntesis de las cadenas  $\beta$  de FSH Y LH, regulando la expresión del gen de las gonadotrofinas (88, 89).

Otros aspectos neurofisiológicos que han sido considerados importantes en el determinismo de la secreción pulsátil de GnRH son la pulsatilidad intrínseca de las propias neuronas (como ha sido comentado) y estímulos aferentes procedentes de los astrocitos (90).

La pulsatilidad de la GnRH puesta de manifiesto por Carmel y cols (60) juega un papel capital en la fisiología de las gonadotrofinas, como evidenciaron las investigaciones de Ernst Knobil (61, 91), que puso de manifiesto:

- La síntesis y liberación de gonadotrofinas es la consecuencia de la acción de GnRH, liberada desde el hipotálamo con un ritmo pulsátil característico
- El enlentecimiento del ritmo de pulsatilidad de GnRH causa la elevación del nivel de FSH y la disminución del nivel de LH y, si el enlentecimiento se acentúa, se produce un hipogonadismo hipogonadotropo
- La aceleración del ritmo de pulsatilidad de GnRH causa la elevación del nivel de LH y la disminución del nivel de FSH y, si la aceleración se acentúa, se produce un hipogonadismo hipogonadotropo, como consecuencia de la desensibilización de los receptores de GnRH.

El fenómeno de la desensibilización de receptores será tratado en la actualización dedicada a agonistas y antagonistas de GnRH.

## DESCARGA PREEVULATORIA DE GONADOTROFINAS

Desde un punto de vista reproductivo, el fenómeno más importante de los que tienen lugar a lo largo del ciclo menstrual es la ovulación, que se produce como consecuencia de la descarga preovulatoria de gonadotrofinas.

Esta descarga preovulatoria es el resultado de un complejo y delicado mecanismo neuroendocrino y endocrino que implica a la GnRH y al estradiol y que tardó en ser bien comprendido. Obstáculos para llegar a conocerlo fueron el

hecho, evidenciado por Knobil (91) y corroborado por nuestro propio equipo (92), de que la administración pulsátil de GnRH a ritmo y dosis constantes basta para que la descarga de gonadotrofinas se produzca y la ovulación tenga lugar.

Esta observación implica que, preovulatoriamente, los niveles circulantes crecientes de estradiol sensibilizan a las células gonadotropas hipofisarias, multiplicando su capacidad de respuesta a la GnRH

Es absolutamente imprescindible que la secreción de GnRH presente su patrón pulsátil para que la mujer sea fértil, ya que la administración continua (o la administración de un agonista) desensibiliza las células gonadotropas induciendo un hipogonadismo hipogonadotropo (93). GnRH estimula la síntesis y liberación de ambas gonadotrofinas, siendo los cambios de frecuencia que experimenta su pulsatilidad los que dan lugar a los cambios que la relación FSH/LH experimenta a lo largo del ciclo menstrual: un aumento de la frecuencia de pulsos favorece la secreción de LH (FSH/LH disminuye), mientras que la disminución de dicha frecuencia favorece la liberación de FSH (94). Finalmente, la acción de las gonadotrofinas estimula la secreción de esteroides ováricos.

El estradiol ejerce un importante retrocontrol sobre la unidad hipotálamo-hipofisaria que se modifica a lo largo de la fase folicular: al inicio de la misma, actuando como retrocontrol negativo, reduce la amplitud de los pulsos de GnRH lo que, junto con una acción inhibitoria de las células gonadotropas, reduce la secreción de gonadotrofinas (95). Avanzada la fase folicular los niveles circulantes de estradiol se incrementan notablemente hasta alcanzar su máximo en estadios preovulatorios; en este momento el estradiol pasa a ejercer un retrocontrol positivo que, en algunas especies, a nivel de las neuronas GnRH, incrementan la liberación de la neurohormona, produciendo una descarga preovulatoria (96) y, a nivel de las células gonadotropas, potencian la respuesta de las mismas; el resultado final es la descarga preovulatoria de gonadotrofinas (97-99).

El efecto estimulador del estradiol se ejerce tanto directamente a nivel de los receptores  $\beta$  de las neuronas GnRH como indirectamente, actuando sobre otras neuronas que expresan receptores  $\alpha$ , kisspeptina o pertenecen a los sistemas gabaérgico/glutamatergico (77, 78, 100).

La dinámica de los niveles circulantes de los esteroides ováricos ( $E_2$  y  $P_4$ ) ha sido detalladamente estudiada y estas investigaciones han permitido concluir que el incremento del estradiol durante un periodo suficiente de tiempo induce una descarga gonadotropa pero, para que esta descarga adquiera la duración suficiente, similar a la de la descarga preovulatoria espontánea, se requiere la acción sinérgica de una discreta elevación de la progesterona, tal y como ocurre en el ciclo espontáneo a partir del folículo preovulatorio (101).

## MECANISMO DE ACCIÓN DE GnRH

Las neuronas secretoras de GnRH representan el impulso final del sistema nervioso central para el control de la fertilidad en los mamíferos.

Ya ha sido comentado que la administración de GnRH sintético a hombres y mujeres causa una marcada elevación de los niveles plasmáticos de LH y un menor pero significativo aumento de los niveles plasmáticos de FSH, como demostraron Kastin y cols (102); en otras palabras, GnRH estimula la liberación y la síntesis de FSH y LH actuando sobre las células gonadotropas hipofisarias. A través de esta acción, es capaz de inducir desarrollo folicular ovárico e incluso ovulaciones (103).

Fue evidenciado que células gonadotropas estimuladas in vitro con la neurohormona muestran un aumento de los niveles intracelulares de adenosina 3'5'-monofosfato concomitante a la liberación de FSH y LH y que la acumulación de AMPc se debe a la activación de adenilato ciclasa (104).

GnRH desarrolla su acción biológica actuando sobre un receptor específico de membrana. El receptor de GnRH (GnRHR o LHRHR) pertenece a la familia de los receptores acoplados a la proteína G, que se expresa en las células gonadotropas y en otros tejidos, como mama, ovario y próstata. Su RNAm se expresa en los citados tejidos y en testículo pero no en hígado y riñón (105). Estudios realizados en células gonadotropas mostraron que existen dos lugares de unión a la neurohormona, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad, siendo el de baja afinidad el implicado en la secreción de gonadotrofinas (106).

Se trata de una proteína de 60 kDa, de la que se conocen numerosas mutaciones que cursan con hipogonadismo hipogonadotropo (107), cuya síntesis es codificada por un gen localizado en el cromosoma 4 (108). A diferencia de otros receptores acoplados a proteína G, carece de dominio C-terminal citoplásmico (109).

Los lectores interesados en la fisiología de los receptores de membrana acoplados a proteína G pueden consultar la publicación de Dong y cols "Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking" (110). Brevemente, se trata de una superfamilia de receptores de la superficie celular acoplados a proteínas G, heterotriméricas, que regulan efectores como adenilato ciclasas, fosfolipasas, proteínquinasas y canales iónicos. Todos ellos presentan 7 asas transmembrana, un N-terminal en el espacio extracelular y un C-terminal intracelular. Son sintetizados en el retículo endoplásmico, pasan al aparato de Golgi y migran hasta la membrana. Una vez estimulados por su ligando, estos receptores pueden internalizarse y unirse a arrestinas; a partir de esta unión, pueden reciclarse y volver a la membrana plasmática o ser

---

degradados en los lisosomas. Este dinámico ciclo intracelular marca el nivel de expresión de receptores en la membrana y juega un papel en la respuesta celular al estímulo.

Los receptores juegan un papel importante en la fisiología de la GnRH:

GnRH estimula la síntesis de sus propios receptores (111), lo que tiene como consecuencia que sucesivas administraciones de la neurohormona incrementen la respuesta a la misma, lo que se ha conocido como “efecto priming” (112); este efecto y su potenciación por los estrógenos se ha relacionado clásicamente con la descarga preovulatoria de gonadotrofinas (113). Este efecto es ejercido tanto por GnRH exógeno como endógeno, como se demostró mediante estimulación del área preóptica en la rata (114).

## USO CLÍNICO DE GnRH

En adelante se utilizará GnRH para nombrar la neurohormona liberadora de FSH y LH.

La síntesis de esta neurohormona permitió su producción y comercialización, haciendo posible su utilización en clínica humana, que vino condicionada por sus más características propiedades biológicas, que pueden resumirse como sigue:

- La administración de GnRH consigue estimular el desarrollo y maduración de folículos ováricos y la ovulación a través de la estimulación gonadotropa, aunque su administración debió ser repetida por vía subcutánea (115) o pulsátil, por vía endovenosa (116, 117), ambos de forma prolongada.
- La administración de GnRH para estimular la función ovárica mostró ser de menor riesgo que el uso de gonadotrofinas porque, aunque algunos afirmaron lo contrario (118), lo cierto es que la generalidad de autores señaló que no se registraban casos de embarazo múltiple (119) y tampoco de síndrome de hiperestimulación (120, 121).
- Investigaciones de Carmel y cols (60) pusieron de manifiesto en sangre recogida en el tallo hipofisario de hembras de macaco que la GnRH es liberada de forma pulsátil debido a mecanismos hipotalámicos. A similares conclusiones llegaron Antunes y cols (62) en la especie humana, extrayendo sangre de la hipófisis en el curso de hipofisectomías.
- La vida media de la GnRH es muy corta, siendo su tiempo de depuración plasmática de minutos (122, 123). Estudios del grupo de Schally la estimaron de 4 minutos en la especie humana (124).

Esta corta vida media hizo necesario que su administración

tuviera que ser repetitiva y de dosis bajas, a nivel de microgramos. Como ha sido señalado, fueron utilizadas la vía subcutánea (115), la vía nasal (125) y, fundamentalmente, la vía endovenosa.

Nuestro grupo utilizó la vías nasal en 10 casos y, la vía endovenosa en 12 casos más (92, 116, 126), concluyéndose que la efectividad por vía venosa es muy superior a la de la vía nasal, alcanzando el 90 % de buenos resultados (instauración o restauración de ciclos menstruales ovulatorios normales) en casos de hipogonadismo hipogonadotropo, que se trata de un método con escasos riesgos y que no requiere controles exhaustivos.

De cualquier forma, se trataban todas ellas de formas engorrosas de tratamiento, sobre todo la endovenosa, que obligaba al uso de una bomba de perfusión conectada a una vena, razones por las que cayeron rápidamente en desuso.

Aunque la utilización clínica de la GnRH se redujo a poco tiempo, debido a razones ya señaladas (vida media, desensibilización, dificultad de administración) merece cierta mención tanto su utilización diagnóstica como su uso terapéutico.

## USO DIAGNÓSTICO

Mostró alguna utilidad en situaciones clínicas de trastorno hipogonadotropo y normogonadotropo del ciclo ovárico, tales como impuberismo, amenorrea de origen hipofisario e hipotalámico.

En su momento fueron usadas distintas dosis, siendo probablemente la de 100  $\mu$ g por vía iv la más utilizada. Sin embargo, nuestro grupo prefirió utilizar la dosis de 10  $\mu$ g por vía iv, considerando que reflejaba mejor la sensibilidad de la hipófisis a la neurohormona.

Sin entrar en detalles, lo que no estaría justificado habiendo caído en desuso, resulta de interés comentar algunas posibles situaciones. Los lectores interesados pueden consultar las investigaciones realizadas por nuestro grupo (127-132).

En los casos de hipogonadismo hipogonadotropo de origen suprahipofisario, la administración de una dosis intravenosa de GnRH (aislada o repetida) permitía comprobar la integridad de la función gonadotropa hipofisaria, aunque mostrando una respuesta de carácter prepuberal (niveles de FSH superiores a los de LH a los 30, 45 y 60 minutos de la administración). Este tipo de respuesta es muy característico de la amenorrea por anorexia nerviosa, por ejemplo.

En casos de hipogonadismo hipogonadotropo por lesión hipofisaria, como en el caso de tumores hipofisarios (acromegalia, prolactinomas, etc), la elevación de gonadotrofinas tras la administración de GnRH no se observa o se muestra disminuida (132).

Conviene señalar que, en las ocasiones en que el sector gonadotropo hipofisario se ha visto severamente afectado durante largo tiempo, puede no responder a la administración de GnRH con la elevación de los niveles de FSH y LH que cabría esperar. Sin embargo, la respuesta puede restablecerse repitiendo los estímulos, como postularon Snyder y cols (133).

En casos de amenorrea normogonadotropa, como en el síndrome de ovario poliquístico, se observa una marcada sensibilidad hipofisaria que se traduce por una respuesta exagerada de la LH.

## USO TERAPÉUTICO

El uso terapéutico de la GnRH se vio favorecido por la capacidad de la neurohormona de inducir el desarrollo folicular y la ovulación, evitando el riesgo de la gestación múltiple (en caso de gestación) y del desarrollo de un síndrome de hiperestimulación ovárica, como ya ha sido citado.

En su día, Leyendecker y cols propugnaron el tratamiento con GnRH crónico pulsátil en los casos de anovulación crónica con test de gestágenos negativo (134), desarrollaron una bomba de perfusión pulsátil (135) y comunicaron excelentes resultados con su empleo (136).

Algunos autores comunicaron buenos resultados obtenidos mediante la administración crónica pulsátil de GnRH vía nasal: asociado a otros fármacos, como clomifeno (137), o gonadotrofinas (125). Nuestro grupo trató por vía nasal a 10 pacientes durante 15 días; los diagnósticos de estas pacientes fueron SOP (4 casos), anorexia nerviosa (3 casos) y disfunción hipotalámica (3 casos) (126). Aunque la respuesta al tratamiento fue variable, en dos de los casos se constató la ovulación.

La vía venosa ha sido la más utilizada y ha proporcionado excelentes resultados, siempre que la indicación fuera correcta, como la elevada tasa de gestación observada por Leyendecker y cols (136) en pacientes afectas de amenorrea de origen hipotalámico. En nuestro caso, la tasa de ovulación en mujeres tratadas por vía venosa fue del 90 % (92).

El ritmo de administración, las dosis administradas y la duración del tratamiento hasta conseguir el efecto terapéutico buscado han sido variable pero, en general, los resultados comunicados han sido excelentes (138, 139) y los efectos secundarios indeseables excepcionales (140).

A pesar de estos buenos resultados, el tratamiento con GnRH natural cayó en desuso y dejó de ser utilizado, para dejar paso a modernas pautas de tratamiento con gonadotrofinas y al uso farmacológico de los análogos agonistas y

antagonistas de la GnRH, de lo que nos ocuparemos en próximas publicaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Marshall F, Verney E.** Sexual periodicity and the causes which determine it. *Philosophical Transactions of The Royal Society: Biological Sciences.* 1936;226:423-56.
2. **Marañón G.** Diabetes insipidus and uterine atony. A case observed over a period of 26 years. *Brit Med J.* 1947(November 15):769 - 71.
3. **Harris G.** Hypothalamus and pituitary gland with special reference to the posterior pituitary and labour. *Brit Med J.* 1948:339 - 42.
4. **Popa G, Fielding U.** A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region. *J Anat Lond.* 1930;65:88 - 91.
5. **Wislocki G, King L.** The permeability of the hypophysis and hypothalamus to vital dyes, wick study of the hypophyseal vascular supply. *Amer Anat.* 1936;58:421.
6. **Malacara J.** Hormonas hipotalámicas y adenohipofisarias. In: Schiaffini O, Oriol Bosch A, Martini L, Motta M, editors. *Neuroendocrinología.* Barcelona: Ediciones Toray, S.A.; 1975.
7. **Greep R.** Citado por AV Schally. 1936.
8. **Schally A, Bowers C, Locke W.** Neurohumoral functions of the hypothalamus. *Am J Med Sci.* 1964;248:79 - 101.
9. **Harris G.** Neural control of the pituitary gland. *Physiol Rev.* 1948;28:139 - 79.
10. **Harris G, Jacobsohn D.** Functional grafts of the anterior pituitary gland. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1952;139:263 - 76.
11. **Harris G.** Further evidence concerning the role of the hypothalamus in the induction of ovulation in the rabbit following injections of cooper acetate. *J Physiol.* 1941;100:231 - 2.
12. **Harris G.** The blood vessels of the rabbit's pituitary gland, and the significance of the pars and zona tuberalis. *J Anat.* 1947;81:343 - 51.
13. **Harris G.** Electrical stimulation of the hypothalamus and the mechanism of neural control of the adenohipofisis. *J Physiol.* 1948;107:418 - 29.
14. **Harris G.** Ovulation in the rabbit. *J Anat.* 1949;83(Pt 1):82.
15. **Halasz B, Pupp L.** Hormone secretion of the anterior pituitary gland after physical interruption of all nervous pathways to the hypophisotropic area. *Endocrinology.* 1965;77:553 - 62.
16. **Hálasz B, Pupp L, Uhlarik S, Tima L.** Further Studies on the Hormone Secretion of the Anterior Pituitary Transplanted Into the Hypophysiotrophic Area of the Rat Hypothalamus. *Endocrinology.* 1965;77:343.
17. **Szentagothai I.** Anatomical considerations. In: Szentagothai I, Flerko B, Mess B, Halasz B, editors. *Hypothalamic control of the anterior pituitary.* Budapest: Akademiai Kiado; 1962. p. 192 - 264.
18. **Schally A, Lipscomb H, Long J, Dear W, Guillemin R.** Chromatography and hormonal activities of dog hypothalamus. *Endocrinology.* 1962;70:470 - 80.
19. **Schally A, Guillemin R.** Isolation and chemical characterization of a beta-CRF from pig posterior pituitary glands. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1963;112:1014 - 7.
20. **Mccann S, Schally A, Nallar R, Bowers C.** Evidence for separate corticotrophin- and luteinizing hormone-releasing factors in hypothalamic extracts. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1964;117:435 - 8.
21. **Schally A, Bowers C.** In vitro and in vivo stimulation of the release of luteinizing hormone. *Endocrinology.* 1964;75:312 - 20.
22. **Schally A, Bowers C.** Purification of Luteinizing hormone-releasing factor from bovine hypothalamus. *Endocrinology.* 1964;75:608 - 14.
23. **Courrier R, Guillemin R, Jutisz M, Sakiz E, Ascheim P.** [Presence in an extract of hypothalamus of a substance stimulating the secretion of the luteinizing hormone of the anterior pituitary (LH)]. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1961;253:922 - 7.
24. **Guillemin R, Jutisz M, Sakiz E.** [The partial purification of an hypo-



- thalamal factor (LRF) stimulating the secretion of pituitary luteinizing hormone (LH)]. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1963;256:504 - 7.
25. **Hayward J, Hilliard J, Sawyer C.** Time of release of pituitary gonadotropin induced by electrical stimulation of the rabbit brain. *Endocrinology*. 1964;74:108 - 13.
  26. **Schiavi R, Jutisz M, Sakiz E, Guillemín R.** Stimulation of ovulation by purified LH-releasing factor (LRF) in animals rendered anovulatory by hypothalamic lesion. *Proc Soc Exp Biol Med* 1963 Nov;114:426-9. 1963;114:426 - 9.
  27. **Ganong W, Frederickson D, Hume D.** *J Clin Endocrinol*. 1954;14:773.
  28. **Schally A, Saito T, Arimura A, Muller E, Bowers C, White W.** Purification of follicle-stimulating hormone-releasing factor (FSH-RF) from bovine hypothalamus. *Endocrinology*. 1966;79:1087 - 94.
  29. **Mittler J, Arimura A, Schally A.** Release and synthesis of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in pituitary cultures in response to hypothalamic preparations. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1970;133:1321 - 5.
  30. **Kastin A, Schally A, Gual C, Midgley AJ, Bowers C, Diaz-Infante AJ.** Stimulation of LH release in men and women by LH-releasing hormone purified from porcine hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1969;29:1046 - 50.
  31. **Matsuo H, Baba Y, Nair R, Arimura A, Schally A.** Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Acta*. 1971;43:1334 - 99.
  32. **Schally A, Kastin A, Arimura A.** Hypothalamic follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) regulating hormone: structure, physiology, and clinical studies. *Fertil Steril*. 1971;22:703 - 21.
  33. **Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemín R.** Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971;44:205 - 10.
  34. **Burgus R, Bulcher M, Amoss M.** Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF). *Proc Nat Acad Sci USA*. 1972;69:278 - 82.
  35. **Arimura A, Matsuo H, Baba Y, Schally A.** Ovulation induced by synthetic luteinizing hormone-releasing hormone in the hamster. *Science*. 1971;174:511 - 2.
  36. **Millar R, Lowe S, Conklin D, Pawson A, Maudsley S, Troskie B, et al.** A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:9636 - 41.
  37. **Morgan K, Millar R.** Evolution of GnRH ligand precursors and GnRH receptors in protochordate and vertebrate species. *Gen Comp Endocrinol*. 2004;139:191 - 7.
  38. **Bugnon C, Bloch B, Fellmann D.** [Cytoimmunological demonstration of LH-RH neurons in the human fetus]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 1976;282:1625 - 8.
  39. **Barry J.** Immunofluorescence study of LRF neurons in man. *Cell Tissue Res*. 1977;181:1 - 14.
  40. **Ramakrishnan S, Lee W, Navarre S, Kozlowski D, Wayne N.** Acquisition of spontaneous electrical activity during embryonic development of gonadotropin-releasing hormone-3 neurons located in the terminal nerve of transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Gen Comp Endocrinol*. 2010;168:401 - 7.
  41. **Whitlock K.** The loss of scents: do defects in olfactory sensory neuron development underlie human disease? *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2015;105:114 - 25.
  42. **Dulac C, Torello T.** Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4:551 - 62.
  43. **Sabado V, Barraud P, Baker C, Streit A.** Specification of GnRH-1 neurons by antagonistic FGF and retinoic acid signaling. *Dev Biol*. 2012;362:254 - 62.
  44. **Albuisson J, Pêcheux C, Carel J, Lacombe D, Leheup B, Lapuzina P, et al.** Kallmann syndrome: 14 novel mutations in KAL1 and FGFR1 (KAL2). *Hum Mutat*. 2005;25:98 - 9.
  45. **Schwanzel-Fukuda M, Pfaff D.** Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature (London)*. 1989;338:161 - 4.
  46. **Schwanzel-Fukuda M, Pfaff D.** The migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons from the medial olfactory placode into the medial basal forebrain. *Experientia*. 1990;46:956 - 62.
  47. **Schwanzel-Fukuda M, Pfaff D.** Migration of LHRH-immunoreactive neurons from the olfactory placode rationalizes olfacto-hormonal relationships. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;39:565 - 72.
  48. **Boehm N, Roos J, Gasser B.** Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells in the nasal septum of human fetuses. *Brain Res Dev Brain Res*. 1994;82:175 - 80.
  49. **Walsh F, Doherty P.** Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: Role in Axon Growth and Guidance. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1997;13:425 - 56.
  50. **Schwanzel-Fukuda M.** Origin and migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in mammals. *Microsc Res Tech*. 1999;44:2 - 10.
  51. **Schwanzel-Fukuda M, Zheng L, Bergen H, Weesner G, Pfaff D.** LHRH neurons: functions and development. *Prog Brain Res*. 1992;93:189 - 201.
  52. **Romanelli R, Barni T, Maggi M, Luconi M, Failli P, Pezzatini A, et al.** Expression and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor in human olfactory GnRH-secreting neurons: an autocrine GnRH loop underlies neuronal migration. *J Biol Chem*. 2004;279:117 - 26.
  53. **Maggi R, Cariboni A, Zaninetti R, Samara A, Stossi F, Pimpinelli F, et al.** Factors involved in the migration of neuroendocrine hypothalamic neurons. *Arch Ital Biol*. 2005;143:171 - 8.
  54. **Whitlock K.** Origin and development of GnRH neurons. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16:145 - 51.
  55. **Fontecha García de Yébenes M, Hoyos Gurrea R, Iglesias Fernández C, Rodríguez Arnao M, Rodríguez Sánchez A.** Síndrome de Kallmann-Maestre de San Juan. Presentación de 2 casos clínicos. *An Pediatr (Barc)*. 2009;71:88 - 9.
  56. **Cortés-Campos C, Letelier J, Ceriani R, Whitlock K.** Zebrafish adult-derived hypothalamic neurospheres generate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. *Biol Open*. 2015;4:1077 - 86.
  57. **Yang-Feng T, Seeburg P, Francke U.** Human luteinizing hormone-releasing hormone gene (LHRH) is located on short arm of chromosome 8 (region 8p11.2-p21). *Somatic Cell Mol Genet*. 1986;12:95 - 100.
  58. **Wetsel W, Culler M, Johnston C, Negro-Vilar A.** Processing of the luteinizing hormone-releasing hormone precursor in the preoptic area and hypothalamus of the rat. *Mol Endocrinol*. 1988;2:22 - 31.
  59. **Santen R, Bardin C.** Episodic luteinizing hormone secretion in man. Pulse analysis, clinical interpretation, and physiological mechanisms. *J Clin Invest*. 1973;52:2617 - 20.
  60. **Carmel P, Araki S, Ferin M.** Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 1976;99:243 - 8.
  61. **Knobil E.** The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Rec Prog Horm Res*. 1980;36:53 - 88.
  62. **Antunes J, Carmel P, Housepian E, Ferin M.** Luteinizing hormone-releasing hormone in human pituitary blood. *J Neurosurg*. 1978;49:382 - 6.
  63. **King J, Anthony E.** LHRH neurons and their projections in humans and other mammals: species comparisons. *Peptides*. 1984;5(Suppl 1):195 - 207.
  64. **Merchenthaler I, Göröcs T, Sétáló G, Petrusz P, Flerkó B.** Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell Tissue Res*. 1984;237:15 - 29.

65. **Krsmanović L, Stojilković S, Merelli F, Dufour S, Virmani M, Catt K.** Calcium signaling and episodic secretion of gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:8462 - 6.
66. **Martínez de la Escalera G, Choi A, Weiner R.** Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:1852 - 5.
67. **Mahachoklertwattana P, Black S, Kaplan S, Bristow J, Grumbach M.** Nitric oxide synthesized by gonadotropin-releasing hormone neurons is a mediator of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced GnRH secretion. *Endocrinology.* 1994;135:1709 - 12.
68. **Krsmanovic L, Mores N, Navarro C, Arora K, Catt K.** An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:2969 - 74.
69. **Martínez-Fuentes A, Hu L, Krsmanovic L, Catt K.** Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor expression and membrane signaling in early embryonic GnRH neurons: role in pulsatile neurosecretion. *Mol Endocrinol.* 2004;18:1808 - 17.
70. **Valença M, Johnston C, Ching M, Negro-Vilar A.** Evidence for a negative ultrashort loop feedback mechanism operating on the luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system. *Endocrinology.* 1987;121:2256 - 9.
71. **Mellon P, Windle J, Goldsmith P, Padula C, Roberts J, Weiner R.** Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron.* 1990;5:1 - 10.
72. **Krsmanović L, Stojilković S, Balla T, al-Damluji S, Weiner R, Catt K.** Receptors and neurosecretory actions of endothelin in hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:11124 - 8.
73. **Meldrum B.** Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.* 2000;130(4S Suppl):1007S - 15S.
74. **Brann D.** Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology.* 1995;61:213 - 25.
75. **Hrabovszky E, Molnár C, Nagy R, Vida B, Borsay B, Rácz K, et al.** Glutamatergic and GABAergic innervation of human gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Endocrinology.* 2012;153:2766 - 76.
76. **Chakraborty T, Ng L, AC G.** Colocalization and hormone regulation of estrogen receptor alpha and N-methyl-D-aspartate receptor in the hypothalamus of female rats. *Endocrinology.* 2003;144:299 - 305.
77. **Christian C, Pielecka-Fortuna J, Moenter S.** Estradiol suppresses glutamatergic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons in a model of negative feedback in mice. *Biol Reprod.* 2009;80:1128 - 35.
78. **Uenoyama Y, Nakamura S, Hayakawa Y, Ikegami K, Watanabe Y, Deura C, et al.** Lack of pulse and surge modes and glutamatergic stimulation of luteinising hormone release in Kiss1 knockout rats. *J Neuroendocrinol.* 2015;27:187 - 97.
79. **Yin W, Sun Z, Mendenhall J, Walker D, Riha P, Bezner K, et al.** Expression of Vesicular Glutamate Transporter 2 (vGluT2) on Large Dense-Core Vesicles within GnRH Neuroterminals of Aging Female Rats. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129633.
80. **Ropert J, Quigley M, Yen S.** Endogenous opiates modulate pulsatile luteinizing hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981;52:583 - 5.
81. **Wardlaw S, Wehrenberg W, Ferin M, Antunes J, Frantz A.** Effect of sex steroids on beta-endorphin in hypophyseal portal blood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;55:877 - 81.
82. **Foradori C, Coolen L, Fitzgerald M, Skinner D, Goodman R, Lehman M.** Colocalization of progesterone receptors in parvicellular dynorphin neurons of the ovine preoptic area and hypothalamus. *Endocrinology.* 2002;143:4366 - 74.
83. **Ferin M, Vande Wiele R.** Endogenous opioid peptides and the control of the menstrual cycle. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1984;18:365 - 73.
84. **Lam N, Ferin M.** Is the decrease in the hypophysiotropic signal frequency normally observed during the luteal phase important for menstrual cyclicity in the primate? *Endocrinology.* 1987;120:2044 - 9.
85. **Weiner R, Martínez de la Escalera G.** Pulsatile release of gonadotropin releasing hormone (GnRH) is an intrinsic property of GT1 GnRH neuronal cell lines. *Hum Reprod.* 1993;8(Suppl 2):13 - 7.
86. **Lin Y, Li X, Shao B, Hu M, Goundry A, Jeyaram A, et al.** The role of GABAergic signalling in stress-induced suppression of gonadotropin-releasing hormone pulse generator frequency in female rats. *J Neuroendocrinol.* 2012;24:477 - 88.
87. **Li X, Shao B, Lin C, O'Byrne K, Lin Y.** Stress-induced inhibition of LH pulses in female rats: role of GABA in arcuate nucleus. *J Mol Endocrinol.* 2015;55:9 - 19.
88. **Wetsel W, Valença M, Merchenthaler I, Liposits Z, López F, Weiner R, et al.** Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:4149 - 53.
89. **Thompson I, Kaiser U.** GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;385:28 - 35.
90. **Terasawa E.** Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons: mechanism of pulsatile LHRH release. *Vitam Horm.* 2001;63:91 - 129.
91. **Knobil E.** The neuroendocrine control of ovulation. *Hum Reprod.* 1988;3:469 - 72.
92. **Juliá M, Gil F, Martín-Cortés A, Domene J, Rodríguez-Ineba A, Galbis M, et al.** Inducción de la ovulación con GnRH crónico pulsátil por vía venosa en siete pacientes diagnosticadas de amenorrea hipotalámica. *Acta Ginecológica.* 1986;43:552 - 8.
93. **Belchetz P, Plant T, Nakai Y, Keogh E, Knobil E.** Hypophyseal responses to continuous and intermitted delivery of hypothalamic gonadotropin releasing hormone. *Science.* 1978;202:631 - 8.
94. **Marshall J, Griffin M.** The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation. *Hum Reprod.* 1993;8(Suppl 2):57 - 61.
95. **Evans N, Dahl G, Glover B, Karsch F.** Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology.* 1994;134:1806 - 11.
96. **Yen S, Tsai C.** Acute gonadotropin release induced by exogenous estradiol during the mid-follicular phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1972;34:298 - 305.
97. **Yen S, Lein A.** The apparent paradox of the negative and positive feedback control system on gonadotropin secretion. *Am J Obstet Gynecol.* 1976;126:942 - 54.
98. **Araki S, Minakami H, Konuma S, Akabori A, Tamada T.** Analysis of the positive feedback effect of estrogen on the release of gonadotropin in women. *Endocrinol Jpn.* 1978;25:59 - 65.
99. **Shaw R.** Estrogen modulation of gonadotropin release. *Proc R Soc Med.* 1975;68:73 - 5.
100. **Petersen S, Ottem E, Carpenter C.** Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol Reprod.* 2003;69:1771 - 8.
101. **Liu J, Yen S.** Induction of midcycle gonadotropin surge by ovarian steroids in women: a critical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983;57:797 - 802.
102. **Kastin A, Schally A, Gual C, Arimura A.** Release of LH and FSH after administration of synthetic LH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1972;34:753 - 6.
103. **Amoss M, Blackwell R, Guillemin R.** Stimulation of ovulation in the rabbit triggered by synthetic LRF. *J Clin Endocrinol Metab.* 1972;34:434 - 6.
104. **Borgeat P, Chavancy G, Dupont A, Labrie F, Arimura A, Schally A.** Stimulation of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate accumulation in anterior pituitary gland in vitro by synthetic luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69:2677 - 81.

105. **Kakar S, Musgrove L, Devor D, Sellers J, Neill J.** Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189:289 - 95.
106. **Spona J.** LH-RH interactions with pituitary receptors: Properties and characterization. *Endocrinol Exp.* 1975;9:127 - 34.
107. **Bédécarrats G, Kaiser U.** Mutations in the human gonadotropin-releasing hormone receptor: insights into receptor biology and function. *Semin Reprod Med.* 2007;25:368 - 78.
108. **Morrison N, Sellar R, Boyd E, Eidne K, Connor J.** Assignment of the gene encoding the human gonadotropin-releasing hormone receptor to 4q13.2-13.3 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet.* 1994;93:714 - 5.
109. **Chi L, Zhou W, Prikhozhan A, Flanagan C, Davidson J, Golembo M, et al.** Cloning and characterization of the human GnRH receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 1993;01:R1 - 6.
110. **Dong C, Filipeanu C, Duvernay M, Wu G.** Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768:853 - 70.
111. **Kaiser U, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin W.** Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology.* 1997;138:1224 - 31.
112. **Aiyer M, Chiappa S, Fink G.** A priming effect of luteinizing hormone releasing factor on the anterior pituitary gland in the female rat. *J Endocrinol.* 1974;62:573 - 88.
113. **Aiyer M, Chiappa S, Fink G, Greig F.** Proceedings: A priming effect of luteinizing hormone releasing factor on the anterior pituitary gland in the female rat. *J Physiol* 1973 Oct;234(2):81P-82P. 1974;234:81P - 2P.
114. **Fink G, Chiappa S, Aiyer M.** Priming effect of luteinizing hormone releasing factor elicited by preoptic stimulation and by intravenous infusion and multiple injections of the synthetic decapeptide. *J Endocrinol.* 1976;69:359 - 72.
115. **Henderson S, Bonnar J, Moore A, Mackinnon P.** Luteinizing hormone-releasing hormone for induction of follicular maturation and ovulation in women with infertility and amenorrhea. *Fertil Steril.* 1976;27:621 - 7.
116. **Juliá M, Ortega L, Gonzalvo L, Escrivá J, Antonio P, Galbis M, et al.** Inducción de la ovulación con GnRH crónico pulsátil por vía venosa en la enfermedad poliquística del ovario (E.P.O.). *Acta Ginecológica.* 1986;43:559 - 66.
117. **Shaw R, Ndukwe G, Imoedemhe D, Burford G, Chan R.** Stimulation of multiple follicular growth for in vitro fertilization by administration of pulsatile luteinizing hormone-releasing hormone during the midfollicular phase. *Fertil Steril.* 1986;46:135 - 7.
118. **Corenblum B, Wiseman D.** Ovarian hyperstimulation with exogenous pulsatile gonadotropin releasing hormone therapy. *J Ultrasound Med.* 1985;4:405 - 10.
119. **Berg D, Mickan H, Michael S, Döring K, Gloning K, Jänicke F, et al.** Ovulation and pregnancy after pulsatile administration of gonadotropin releasing hormone. *Arch Gynecol.* 1983;233:205 - 10.
120. **Eckstein N, Vagman I, Eshel A, Naor Z, Ayalon D.** Induction of ovulation in amenorrheic patients with gonadotropin-releasing hormone and human menopausal gonadotropin. *Fertil Steril.* 1985;44:744 - 50.
121. **Ross L, Robertson G, Milton P, Blows R.** The induction of ovulation using pulsatile luteinizing hormone releasing hormone in clinical practice. *Br J Obstet Gynaecol.* 1985;92:815 - 9.
122. **Miyachi Y, Mecklenburg R, Hansen J, Lipsett M.** Metabolism of 125 I-luteinizing hormone-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1973;37:63 - 7.
123. **Jeffcoate S, Greenwood R, Holland D.** Blood and urine clearance of luteinizing hormone releasing hormone in man measured by radioimmunoassay. *J Endocrinol.* 1974;60:305 - 14.
124. **Redding T, Kastin A, Gonzales-Barcelona D, Coy D, Coy E, Schalch D, et al.** The half-life, metabolism and excretion of tritiated luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1973;37:626 - 31.
125. **Potashnik G, Homburg R, Eshkol A, Insler V, Lunenfeld B.** Hormonal responses to nasal application of synthetic gonadotropin-releasing hormone in amenorrheic patients pretreated with gonadotropins. *Int J Fertil.* 1980;25:234 - 8.
126. **Juliá M.** Inducción de la ovulación con GnRH crónico pulsátil. Un modelo fisiológico de tratamiento del hipogonadismo femenino [Investigación clínica]. Valencia: Valencia; 1984.
127. **García-Mora R.** Investigaciones sobre la actividad gonadotropa y somatotropa en el hipogonadismo femenino [Investigación clínica]. Valencia: Valencia; 1978.
128. **Romeu A.** Investigación de las funciones lactotropa y gonadotropa en el síndrome de hipogonadismo y galactorrea. Resultados obtenidos en la terapéutica del mismo con un agente dopaminérgico [Investigación clínica]. Valencia: Universidad de Valencia; 1979.
129. **Oltra D.** Investigaciones fisiopatológicas del eje hipotálamo-hipofiso-ovárico: perfusión Lh-RH. Valencia: Valencia; 1982.
130. **García-Mora R, Perez-Pastor J, Rodríguez-Ineba A, Zabala P, Aboy F, Martín-Cortés A, et al.** Valoración del test de LH-RH en la mujer fértil normal. *Rev Esp Obst Gin.* 1977;34:505 - 25.
131. **García-Mora R, Zabala P, Mompó E, Perez-Pastor J, Bolufer P, Romeu A.** La reserva gonadotropa hipofisaria en el hipogonadismo primitivo ovárico. *Rev Esp Obst Gin.* 1981;40:208 - 20.
132. **García-Mora R, Zabala P, Rodríguez-Ineba A, Bolufer P, Romeu A.** Investigaciones sobre la reserva gonadotropa en pacientes con enfermedad orgánica hipofisaria. *Rev. Esp. Obst. Gin.* 40: 59-71. *Rev Esp Obst Gin.* 1981;40:59 - 71.
133. **Snyder P, Rudenstein R, Gardner D, Rothman J.** Repetitive infusion of gonadotropin-releasing hormone distinguishes hypothalamic from pituitary hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979;48:864 - 8.
134. **Leyendecker G, Struve T, Plotz E.** Induction of ovulation with chronic intermittent (pulsatile) administration of LH-RH in women with hypothalamic and hyperprolactinemic amenorrhea. *Arch Gynecol.* 1980;229:177 - 81.
135. **Leyendecker G, Wildt L, Hansmann M.** Pregnancies following chronic intermittent (pulsatile) administration of Gn-RH by means of a portable pump ("Zyklomat")--a new approach to the treatment of infertility in hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;51:1214 - 6.
136. **Leyendecker G, Wildt L.** Induction of ovulation with chronic intermittent (pulsatile) administration of Gn-RH in women with hypothalamic amenorrhoea. *J Reprod Fertil.* 1983;69:397 - 409.
137. **Phansey S, Barnes M, Williamson H, Sagel J, Nair R.** Combined use of clomiphene and intranasal luteinizing hormone-releasing hormone for induction of ovulation in chronically anovulatory women. *Fertil Steril.* 1980;34:448 - 51.
138. **Schoemaker J, Simons A, van Osnabrugge G, Lugtenburg C, van Kessel H.** Pregnancy after prolonged pulsatile administration of luteinizing hormone-releasing hormone in a patient with clomiphene-resistant secondary amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981;52:882 - 5.
139. **Miller D, Reid R, Cetel N, Rebar R, Yen S.** Pulsatile administration of low-dose gonadotropin-releasing hormone. Ovulation and pregnancy in women with hypothalamic amenorrhea. *JAMA.* 1983;250:2937 - 41.
140. **Potashnik G, Lunenfeld E, Spitz E, Glezerman M.** Anaphylactic reaction to gonadotropin-releasing hormone. *N Engl J Med.* 1993;328:815.