

Regulación de la actividad GnRH. Los sistemas Kisspeptina/GPR54 y GnIH/GPR147

GnRH activity regulation. Kisspeptin/GPR54 and GnIH/GPR147 systems

Alberto Romeu*¹, Vicente López Villaverde², Ana Monzó³, Israel Obed Carmona Ruiz⁴, Mónica Romeu³

¹Ex-jefe de servicio de Reproducción Humana. Hospital U. La Fe. Valencia

²Embryocenter CIVTE. Sevilla

³Servicio de Reproducción Humana. Hospital U. La Fe. Valencia

⁴Clínica IMAR. Murcia

RESUMEN

Objetivo: Revisar y actualizar la fisiología de la regulación de fertilidad y reproducción, poniendo especial énfasis en los factores neuroendocrinos que controlan la secreción pulsátil de GnRH.

Material y métodos: Revisión bibliográfica, utilizando como palabras clave “GnRH”, “Kisspeptin”, “GnIH”, “RF-amide” y RPRF-3, entre otras.

Resultados: Siendo la secreción pulsátil de GnRH el elemento clave para el control de la secreción de gonadotropinas, se describen los mecanismos neuroendocrinos (Kisspeptina, GnIH) que regulan la actividad de las neuronas GnRH.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; 33; 33-41 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Palabras clave: *GnRH, Kisspeptina, GnIH, GPR54, GPR147, Fertilidad, Regulación, Fisiología*

SUMMARY

Objective: To Review and update the physiology regulating fertility and reproduction, with particular emphasis on neuroendocrine factors controlling the pulsatile secretion of GnRH.

Aceptado: 20 Mayo 2016

Correspondencia: Alberto Romeu

aromeu2000@hotmail.com

Tf.: 629 124 462

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

Material and methods: Review of the literature, using as key words "GnRH", "Kisspeptin", "GnIH", "RF-amide" and RPRF-3, among others.

Results: Being the pulsatile secretion of GnRH the key element for the control of gonadotrophin secretion, the neuroendocrine mechanisms (Kisspeptine, GnIH) that regulate the activity of GnRH neurons are described.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; 33; 33-41 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Key words: *GnRH, Kisspeptin, GnIH, GPR54, GPR147, Fertility, Regulation, Fisiology*

INTRODUCCIÓN

La función reproductora es, obviamente, de capital importancia para todas las especies, incluida la humana y, en consecuencia, para proteger esas mismas especies, tiene que estar exquisitamente regulada. Para que esta regulación sea posible en la mujer y en otras especies biológicas es necesaria la coordinación de la actividad de distintas estructuras: las células hipotálamicas neurosecretoras productoras de GnRH, el sector gonadotropo de la adenohipófisis productor de gonadotrofinas y los ovarios, productores de esteroides y de hormonas proteicas y portadores y liberadores de ovocitos.

Una adecuada secreción pulsátil es indispensable para el mantenimiento de la función reproductora (1-3) y ésta es el resultado de la actividad intrínseca de las neuronas GnRH (4) y de otras aferencias que alcanzan estas neuronas (5). Por otra parte, la función reproductora está relacionada con otros aspectos de la fisiología, como bienestar general, inmunidad, reserva energética, estrés, y del entorno, como luz, temperatura, duración del día, determinados olores, etc. Por esta razón, la capacidad reproductiva depende del adecuado equilibrio de numerosos reguladores endógenos y exógenos que pueden modificar la actividad del oscilador hipotálamico.

La síntesis y liberación de GnRH, neurohormona que actúa sobre la adenohipófisis estimulando la síntesis y liberación de gonadotrofinas constituye la piedra angular de la regulación de la función reproductora. Esta neurohormona, caracterizada y sintetizada en la década de 1960 (6-10), no solo estimula la secreción gonadotropa; además, el ritmo y amplitud de los pulsos que caracterizan su secreción determinan el nivel circulante relativo de ambas gonadotrofinas (11) así como la descarga preovulatoria de gonadotrofinas (12, 13), todo ello orquestado por los niveles circulantes de esteroides ováricos (2, 14), entre otros factores.

La secreción de GnRH depende de las neuronas especializadas que sintetizan y liberan la neurohormona pero ha sido afirmado que estas neuronas carecen de los receptores de estradiol necesarios para cumplir adecuadamente esta función (15). Aunque esta afirmación ha sido discutida (16),

por ésta u otra razón, parece necesario que otras neuronas transmitan impulsos reguladores de la función de las secretoras de GnRH (17).

Por otra parte, siendo la GnRH quien controla la función hipofisaria en todas las especies de mamíferos y presentando las distintas especies distintos tipos de regulación de su fertilidad (estacional como la yegua y la oveja, circunstancialmente social como la oveja, cíclica como la mujer), se hace necesario que la actividad de la GnRH responda a distintos estímulos, como fotoperiodo, estímulos olfativos y nivel circulante de esteroides, por ejemplo. No obstante, estos elementos de control de anestro/estro no son excluyentes y pueden modificarse en una misma especie, en dependencia de las circunstancias.

Un buen ejemplo de esta afirmación es la yegua, poliéstrica estacional en estado salvaje, pasando un porcentaje no despreciable de las mismas a ovular a lo largo de todo el año cuando se hallan en cautividad (18).

Las hembras de especies animales cuyas épocas de anestro son estacionales presentan estas características porque son dependientes del fotoperiodo. En efecto, la duración de los periodos alternantes luz/oscuridad (día/noche) determina la sensibilidad del retrocontrol negativo del estradiol característica de la temporada de anestro.

Así, la oveja, por ejemplo, durante la temporada de anestro muestra una gran sensibilidad para el citado retrocontrol (19) y esta situación se produce como consecuencia de los días largos (20) a través de modificaciones inducidas sobre la actividad de la glándula pineal (21). El retrocontrol negativo del estradiol se ejerce en la oveja inhibiendo la expresión de RNAm de Kiss 1 a nivel de las neuronas del núcleo arcuato (22), lo que, a su vez resulta en una inhibición gonadotropa vía GnRH. En esta inhibición también parece jugar un papel un aumento de la actividad de la GnIH (23). Por el contrario, la transición a días cortos se acompaña de un aumento del número de neuronas Kiss en el núcleo arcuato y en el área preóptica y, consecuentemente, un aumento de la actividad de la kisspeptina (24), lo que se traduce en aumento de la actividad GnRH, de la secreción tónica de LH y del retrocontrol positivo del estradiol (24).

Las ovejas, como la mayoría de los criadores estacionales, utilizan el fotoperiodo como la principal referencia ambiental para establecer la época del año. Las ovejas tienen una temporada de cría caracterizada por una sucesión de ciclos de estro, que generalmente comienzan a fines de verano o a principios de otoño y finalizan a finales de invierno o al principio de la primavera en el hemisferio norte, aunque varían según la raza y la latitud.

En la regulación estacional de la reproducción tiene una importancia capital la vía retino-hipotalámica, en la que la secreción de melatonina es un elemento determinante. El fotoperiodo es captado y transmitido por un sistema que incluye los fotoreceptores retinianos, que envían sus señales al núcleo supraquiasmático; éste, a su vez, conecta con el núcleo supraventricular e inerva la glándula pineal. Se trata pues de un sistema fotoneuroendocrino (25): la glándula pineal libera melatonina exclusivamente por la noche, por lo que la duración de la secreción varía según la duración del día y constituye la traducción endocrina del fotoperiodo (26). La melatonina transmite información de la longitud del día al eje hipotálamo-hipófiso-gonadal ejerciendo acciones indirectas sobre el sistema Kiss1/GPR54 (27), responsable de controlar la liberación de GnRH y, a su vez, de gonadotrofinas y esteroides sexuales.

A pesar del marcado carácter estacional de la reproducción de la oveja, éste puede modificarse, como en otras especies de mamíferos, por estímulos del entorno, como la presencia de un macho: la ovulación puede ser inducida en hembras quiescentes mediante la exposición a un macho sexualmente activo, lo que se conoce como “efecto ram” o “efecto macho” (28, 29).

Este fenómeno traduce los efectos de determinados estímulos, fundamentalmente olfativos, a distintas sustancias andrógeno-dependientes que no son específicas de especie pero pueden permitir el reconocimiento de determinados machos (29).

Aunque es requerida una confirmación, al parecer, el efecto ram implica que el olor del macho es procesado por un circuito que incluye el bulbo olfatorio principal y al núcleo cortical de la amígdala, desde donde los estímulos alcanzan las neuronas kiss del área preóptica y del núcleo arcuato; estas neuronas activan a las neuronas GnRH induciendo la secreción de LH y, en consecuencia, de estradiol.

En otras palabras, la oveja presenta, básicamente, una regulación estacional de su ciclo reproductivo, que utiliza básicamente la vía retino-hipotalámica. No obstante, su fase de anestro puede ser interrumpida vía olfativa, si se produce la estimulación por los olores de un macho sexualmente activo (30). Ambas vías, la estacional y la olfativa, coinciden en provocar aumentos de la secreción de LH y estradiol que,

finalmente, desembocan en una descarga preovulatoria de la primera (29, 31).

El “efecto ram” es, sin embargo, algo más complejo. Si bien la vía olfativa, estimulada por el olor que el macho desprende, a partir de su lana y de la secreción de su glándula ante-orbital (30), es fundamental también juegan un papel el comportamiento de cortejo del macho (32) y el aprendizaje y previa experiencia de la hembra (33).

La estacionalidad y el “efecto ram” tienen, claramente, un carácter finalista: la disponibilidad de alimentos y la disponibilidad del macho y ello es importante para especies animales que lo precisan. La especie humana ha sido capaz de adaptar tanto su alimentación (absolutamente omnívoros) como su entorno y, en consecuencia, de no depender de las estaciones. Como las especies animales domesticadas, es capaz de reproducirse durante todo el año y su reproducción ha dejado de estar fisiológicamente regulada por factores ambientales: se regula por mecanismos endógenos, de los que el más importante es el nivel circulante de esteroides ováricos.

En el presente artículo se revisan los mecanismos neuroendocrinos que controlan la actividad de las neuronas GnRH en la especie humana.

NEUROPEPTIDOS RFAMIDA

Recientemente fueron identificados distintos péptidos que se caracterizan por un carboxiterminal arginina y una fenilalanina amidada (Arg-Phe-NH₂); se conocen como RFamida. Se sabe que en los mamíferos existen cinco genes que codifican a los miembros de esta familia y cinco receptores acoplados a proteína G a través de los que los péptidos de la familia RFamida actúan.

Los péptidos RFamida presentes en mamíferos pueden ser divididos en cinco grupos: el neuropéptido FF (NPFF), el inhibidor de gonadotrofinas (GnIH), el grupo 26RFa, el grupo Kisspeptina/metastina y el péptido liberador de prolactina (Prolactin-releasing peptide, PrRP) (34).

Los péptidos naturales Kiss RFamida, de 54, 14 ó 13 aminoácidos fueron aislados de la placenta humana (35), mientras que Kisspeptina-10 fue sintetizado (36). Estos tres péptidos naturales o endógenos derivan del gen KISS-1 (37), un gen supresor de metástasis para las células del melanoma (38).

Los péptidos GnIH han sido caracterizados en distintas especies, incluyendo la humana y su acción biológica se caracteriza por inhibir la secreción de gonadotrofinas a nivel hipotálamo-hipofisario, como se concreta más abajo.

Todos estos avances en el campo de la neurociencia llevan

a pensar que GnIH y GnRH son reguladores de la función reproductora, siendo, además, la Kisspeptina y la GnIH reguladoras de la actividad de las neuronas GnRH y que establecen un puente entre distintos factores (esteroides, marcadores energéticos, fotoperiodo, estrés ...) y función reproductora (39, 40).

Por otra parte, Kisspeptina puede actuar sobre diversas regiones cerebrales para facilitar distintos comportamientos sociales, interactuando con diferentes tipos de neurotransmisores (41).

Recientes estudios han evidenciado que Kiss1, una de las formas de esta familia de péptidos regula determinados comportamientos del pez cebra (42) y que GnIH inhibe la conducta socio-sexual de los pájaros (43).

GNIH

Hallazgos que han tenido lugar desde el año 2000 indican que la GnRH no es el único neuropéptido que participa en la regulación de la reproducción, sino que el péptido inhibidor de la síntesis de gonadotropinas juega un papel importante. En esta época Tsutsui y cols identificaron en el SNC de la codorniz un péptido hipotalámico que actúa sobre la hipófisis inhibiendo la secreción de gonadotropinas y le denominaron GnIH (44). Cuerpos celulares y terminales nerviosas conteniendo GnIH fueron inmunohistoquímicamente localizados en el núcleo paraventricular y en la eminencia media, respectivamente (44). Poco a poco, se conoció que este péptido está presente en todas las especies de aves estudiadas y que cumple en ellas la función de inhibir la secreción de gonadotropinas (45).

El péptido inhibidor de la secreción de gonadotropinas, de la familia de los péptidos RFamida, fue caracterizado en el cerebro de las aves en 2001, localizándose la expresión del gen que codifica su síntesis exclusivamente en el diencefalo (46).

GnIH ejerce su acción a nivel de las células diana a través de un receptor específico unido a proteína G, GPR147, que se expresa en la adenohipófisis y en el hipotálamo (47). En consecuencia, GnIH parece inhibir la secreción de gonadotropinas actuando directamente sobre la hipófisis y también inhibiendo la liberación de GnRH (47).

Tsutsui y col. Identificaron ortólogos de GnIH en otros vertebrados, incluido mamíferos (48). Del mismo modo que en las aves, los ortólogos de GnIH de los mamíferos actúan como neurohormonas en la inhibición de la liberación de gonadotropinas (49), habiendo conservado esta función a lo largo de la evolución (50, 51).

Los péptidos similares a GnIH fueron identificados, siendo

denominados RFRP-1, RFRP-2 y RFRP-3 y su actividad fue determinada. Utilizando muestras de hipotálamo e hipófisis humanas, tanto los péptidos RFRP-1, RFRP-2 y RFRP-3 como su receptor específico, GPR147, fueron identificados en la especie humana (52), lo que sugiere que la vía GnIH-GPR147 se ha conservado a lo largo de la evolución (53, 54).

Ubuka y cols (52) identificaron homólogos de GnIH en un extracto de hipotálamo humano utilizando un anticuerpo GnIH aviar y mediante espectrometría de masas: RFRP-1 y RFRP-3 humanos. Las neuronas productoras de GnIH han sido localizadas en los núcleos hipotalámicos dorsomedial y paraventricular en la especie ovina (55), con proyecciones axonales en el área preóptica y la eminencia media (52); estas neuronas inhiben la secreción gonadotropa basal y estimulada por GnRH (55). RFRP-3 regula la actividad de las neuronas GnRH, lo que sugiere que también puede ser activo a este nivel en la especie humana (56, 57).

La expresión del RNAm del receptor humano de GnIH (GPR147) ha sido identificada en el hipotálamo y en las células gonadotropas de la hipófisis (52). Además, GnIH ha mostrado una modulación inhibitoria de la secreción de LH estimulada por GnRH actuando directamente sobre la hipófisis (58). Tanto RFRP-1 como RFRP-3 se unen con similar afinidad al mismo receptor, GPR147, y activan similares vías intracelulares, lo que permite suponer un mecanismo amplificador del mensaje (52).

RFRP-3 actúa también sobre el apetito y sobre la conducta sexual en la rata (59).

La presencia de receptores específicos para GnIH ha sido demostrada en las gónadas de aves y mamíferos, lo que permite suponer que, además de inhibir directamente la secreción de gonadotropinas, puede ejercer otras acciones (60). Dos reguladores centrales, GnRH y Kisspeptina estimulan la expresión de receptores de GnIH en las células gonadotropas hipofisarias y en las neuronas GnRH (61).

Las neuronas GnIH regulan no solo la síntesis y liberación de gonadotropinas en la adenohipófisis sino que, así mismo, regulan la actividad de distintos tipos de neuronas en el cerebro, tales como GnRH, dopamina, POMC, NPY, orexina, MCH, CRH, occitocina y kisspeptina (62).

Investigaciones de Ubuka y cols. en aves (codornices) permitieron evidenciar que la melatonina participa en el control de la síntesis de GnIH, actuando sobre el RNAm del mismo neuropéptido (63), estimulando su expresión y, en consecuencia, elevando los niveles de GnIH de forma dosis-dependiente. Esta acción de la melatonina se ejerce a través de su unión al receptor Mel1c presente en las neuronas GnIH situadas en el núcleo periventricular (NPV). En el

contexto de estas investigaciones, posteriores estudios mostraron que la melatonina puede estimular la liberación de GnIH en el hipotálamo (64) y participar así en la regulación de la función reproductora, modificando la liberación de gonadotropinas.

La capacidad de controlar simultáneamente reproducción y metabolismo pretende garantizar que gestaciones y nacimientos se producen en un ambiente en que la alimentación permite la supervivencia de la descendencia y el bienestar materno (65). Tanto la obesidad como el déficit alimentario crónico pueden suponer un estrés energético (66) y éste conducir a alteraciones de la secreción de GnRH/LH, en las que puede jugar un papel la GnIH, vía leptina y/o kisspeptina (40, 67).

En ocasiones, situaciones de estrés pueden traducirse clínicamente en un hipogonadismo. En la fisiopatología de tales situaciones también se ha implicado a la GnIH (62, 68, 69).

SISTEMA KISSPEPTINA/GPR54

(Figura 1)

Durante los últimos años se ha generado un importante avance en los conocimientos de la regulación de la función reproductora, entre los que destaca el sistema Kisspeptina/GPR54.

Las Kisspeptinas, neuropéptidos del grupo RFamida, son una familia de péptidos codificados por el gen *Kiss1* (35, 37), localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q32), que actúan uniéndose al receptor acoplado a la proteína G denominado GPR54 o Kiss1R (35).

La estimulación de GPR54 por la Kisspeptina constituye el más potente estímulo fisiológico para la secreción de GnRH y es indispensable para alcanzar los elevados niveles de éste necesarios para procesos como pubertad y ovulación; sin embargo, la falta del estímulo de la Kisspeptina no anula totalmente la secreción de GnRH y permite un cierto nivel de gonadotropinas (70).

La estimulación continua con Kisspeptina desencadena un fenómeno de desensibilización (71) que se produce a nivel del receptor GPR54, puesto que la acción estimuladora del glutamato se conserva.

Las Kisspeptinas se sintetizan como pre-pro-Kisspeptina, un péptido precursor de 145 aminoácidos que, por proteólisis y amidación da lugar a la proteína biológicamente activa, de 54 aminoácidos. Otros fragmentos del precursor, de distinto tamaño y cierta actividad biológica han sido identificados.

El papel de las Kisspeptinas y su receptor en la fisiología reproductiva no fue conocido hasta 2003, año en que fueron

descritos casos de hipogonadismo hipogonadotropo idiopático como consecuencia de mutaciones del gen del receptor GPR54 (72, 73).

GPR54 es un receptor formado por 7 dominios transmembrana, asociado a proteínas G, cuya activación produce un aumento del Ca^{++} intracelular sin cambios en el nivel de AMPc, a través de señales intracelulares en que participan $G\alpha_q/11$ - and β -arrestina que median la secreción de GnRH (74). El aumento de Ca^{++} intracelular se debe a la activación de la fosfolipasa C y a la generación de inositol trifosfato y diacilglicerol y PKC (75).

Independientemente de las acciones intracelulares señaladas, la activación de otras por la Kisspeptina, como las MAPK pueden desarrollar acciones antiproliferativas y antimigrativas, en resumen, antimetastásicas (51).

Los receptores Kiss1R presentan la capacidad de internalizarse y desensibilizarse tras continua exposición a su ligando (326), siendo después reciclados hacia la membrana celular (29). También presentan la propiedad de heterodimerizarse con el receptor de GnRH (354).

Los individuos portadores de mutaciones o deleciones inactivadoras de GPR54 presentan infantilismo genital, fallo de la función gonadal e hipogonadotropismo y conservan la capacidad de responder a GnRH exógeno (401), lo que excluye alteraciones a nivel hipofisario. La migración de las células GnRH está conservada en ratones experimentales carentes de la expresión de *Kiss1* (93).

NEURONAS PRODUCTORAS DE KISSPEPTINA

En distintas especies de mamíferos, las neuronas productoras de Kisspeptina (NK) se localizan fundamentalmente en el área preóptica y en el núcleo arcuato (76), poblaciones celulares que también han sido identificadas en la especie humana (77), aunque existen ciertas diferencias en la localización de estas neuronas entre las distintas especies. En efecto, en el hombre, las neuronas que expresan Kisspeptina en el núcleo infundibular (equivalente al arcuato de otras especies) coexpresa NKB pero escasa Dynorfina (78, 79); por el contrario, existe evidencia de que las mismas neuronas del núcleo infundibular de las mujeres expresan Kisspeptina, Dynorfina y NKB (80-82).

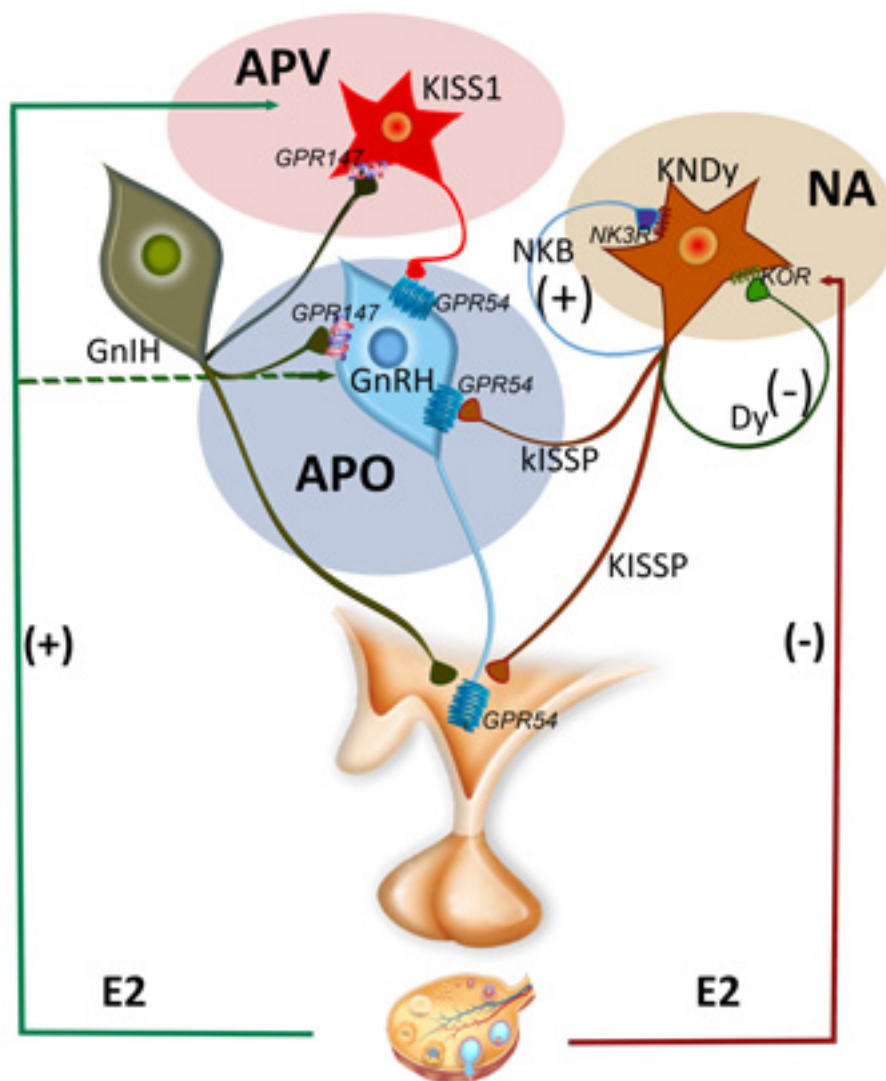
La presencia de *KISS1*mRNA fue documentada en ganglios basales e hipotálamo en el cerebro humano en 2001, época en que también se localizó la expresión de GPR54 (83).

Las neuronas del área periventricular anterior del III ventrículo muestran un importante dimorfismo, siendo mucho más abundantes en las hembras (84), lo que se relaciona con la acción organizadora de la testosterona neonatal. Estas

FIGURA 1

En las mujeres, las neuronas kisspeptinas en el núcleo arcuato (NA), denominadas KNDy, expresan NKB, Dy y Kisspeptinas. Las neuronas que sintetizan Dy expresan receptores a progesterona y ejercen un retrocontrol negativo del estradiol sobre la GnRH tras unión a receptores KOR. Las neuronas del Área periventricular (APV) son más abundantes en la mujer y se correlacionan con el retrocontrol negativo del estradiol. Las neuronas GnIH regulan la actividad de las distintas neuronas, como las kisspeptinas.

Conexiones hipotálamo-hipofisarias



APO: área preóptica; NA: núcleo arcuato; APV: área periventricular

neuronas se han relacionado con el retrocontrol positivo del estradiol (85) y co-expresan actividades gabaérgicas y glutamatérgicas (86).

Determinadas neuronas del área periventricular son el substrato del retrocontrol positivo del estradiol (87). En animales inferiores se produce una descarga de GnRH que va inmediatamente seguida por la descarga preovulatoria de gonadotropinas pero en la especie humana no parece necesario que se produzcan cambios preovulatorios en la secreción de GnRH para que la descarga preovulatoria de gonadotropinas se produzca (88).

El estudio del fenotipo de las neuronas Kiss de núcleo arcuato ha evidenciado que, además de kisspeptina, expresan Neurokinina B (NKB) y Dinorfina (Dy), por lo que se las conoce como neuronas KNDy (89). Estos tres productos se almacenan de forma independiente, en vesículas diferenciadas, en el interior de las células KNDy (90).

Algunas características de las células KNDy tienen particular importancia: 1) están ampliamente interconectadas, lo que favorece la funcionalidad unitaria 2) expresan receptores a estradiol (ER α) a progesterona y a andrógenos, lo que les confiere un papel clave en la regulación del sistema H-H-G (89).

La mayor parte de las células que sintetizan Dinorfina expresan receptores a la progesterona y están implicadas en el retrocontrol negativo de la progesterona sobre la GnRH (91). Dinorfina es un miembro de la familia de los péptidos opioides endógenos (POE) que actúa a través del receptor opioide kappa (KOR) (92).

NKB juega un papel importante en la estimulación del desarrollo folicular en la mujer (93).

Ha sido postulada una hipótesis sobre la forma en que las neuronas KNDy, sintetizando y liberando simultáneamente tres péptidos, Kiss, NKB y Dy, pueden regular la síntesis y liberación de GnRH. NKB y Dy pueden actuar autosinápticamente sobre las células KNDy que, a su vez, actuarían sobre las neuronas GnRH utilizando kisspeptina como efector.

Neuronas Kiss1 del núcleo arcuato constituyen un eslabón importante para la integración de las señales que transmiten los esteroides sexuales causantes del retrocontrol negativo que se ejerce sobre las neuronas GnRH y, a su través, a las células gonadotropas (94). Estos efectos inhibidores de las neuronas Kiss se ejercen a través de los receptores alfa de estradiol (ER α) (95). Al margen de las neuronas Kiss, la participación de la hipófisis en el retrocontrol negativo ha sido documentada (96).

BIBLIOGRAFÍA

1. 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.

2. Knobil E. The neuroendocrine control of ovulation. *Hum Reprod*. 1988;3:469 - 72.
3. Steele P, McDonnell L, Judd S. Activity of gonadotropin-releasing hormone neurons during the preovulatory luteinizing hormone surge. *Fertil Steril*. 1986;45:179 - 84.
4. 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.
5. Borsay B, Skrapits K, Herczeg L, Ciofi P, Bloom S, Ghatei M, et al. Hypophysiotropic gonadotropin-releasing hormone projections are exposed to dense plexuses of kisspeptin, neurokinin B and substance p immunoreactive fibers in the human: a study on tissues from postmenopausal women. *Neuroendocrinology*. 2014;100:141 - 52.
6. Schiavi R, Jutisz M, Sakiz E, Guillemin R. Stimulation of ovulation by purified LH-releasing factor in animals rendered anovulatory by hypothalamic lesion. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1963;114:426 - 9.
7. Igarashi M, McCann S. A hypothalamic follicle stimulating hormone-releasing factor. *Endocrinology*. 1964;74:446 - 52.
8. Igarashi M, Nallar R, McCann S. Further studies on the follicle-stimulating hormone-releasing action of hypothalamic extracts. *Endocrinology*. 1964;75:901 - 7.
9. Schally A, Bowers C. Purification of Luteinizing hormone-releasing factor from bovine hypothalamus. *Endocrinology*. 1964;75:608 - 14.
10. 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.
11. Knobil E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Rec Prog Horm Res*. 1980;36:53 - 88.
12. 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.
13. Evans N, Dahl G, Caraty A, Padmanabhan V, Thrun L, Karsch F. How much of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge is required for generation of the luteinizing hormone surge in the ewe? Duration of the endogenous GnRH signal. *Endocrinology*. 1996;137:4730 - 7.
14. 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.
15. Sullivan K, Witkin J, Ferin M, Silverman A. Gonadotropin-releasing hormone neurons in the rhesus macaque are not immunoreactive for the estrogen receptor. *Brain Res*. 1995;685:198 - 200.
16. Wolfe A, Wu S. Estrogen receptor- β in the gonadotropin-releasing hormone neuron. *Semin Reprod Med*. 2012;30:23 - 31.
17. Roa J, Tena-Sempere M. KiSS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *Gen Comp Endocrinol*. 2007;153:132 - 40.
18. Plotka E, Vevea D, Eagle T, Siniff D, Tester J. Ovarian function in captive feral mares. *J Wildl Dis*. 1989;25:574 - 9.
19. Goodman R, Legan S, Ryan K, Foster D, Karsch F. Importance of variations in behavioural and feedback actions of oestradiol to the control of seasonal breeding in the ewe. *J Endocrinol*. 1981;89:229 - 40.
20. Legan S, Winans S. The photoneuroendocrine control of seasonal breeding in the ewe. *Gen Comp Endocrinol*. 1981;45:317 - 28.
21. Bittman E, Karsch F, Hopkins J. Role of the pineal gland in ovine photoperiodism: regulation of seasonal breeding and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*. 1983;113:329 - 36.
22. Smith J. Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Res Rev*. 2008;57:288 - 98.
23. Smith J. The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. *Domest Anim Endocrinol*. 2012;43:75 - 84.

24. **Chalivoix S, Bagnolini A, Caraty A, Cognié J, Malpoux B, Dufourny L.** Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. *J Neuroendocrinol.* 2010;22:110 - 8.
25. **Malpoux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P.** Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms.* 2001;16:336 - 47.
26. **Simonneaux V, Ribelayga C.** Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev.* 2003;55:325 - 95.
27. **Revel F, Ansel L, Klosen P, Saboureau M, Pévet P, Mikkelsen J, et al.** Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8:57 - 65.
28. **Martin G, Scaramuzzi R.** The induction of oestrus and ovulation in seasonally anovular ewes by exposure to rams can provide useful synchrony of oestrus for artificial insemination, and also some gains in fecundity. There is considerable potential for using the effect in intensive breeding programmes. *J Steroid Biochem.* 1983;19:869 - 75.
29. **Fabre-Nys C, Kendrick K, Scaramuzzi R.** The "ram effect": new insights into neural modulation of the gonadotrophic axis by male odors and socio-sexual interactions. *Front Neurosci.* 2015;9:111.
30. **Cohen-Tannoudji J, Einhorn J, Signoret J.** Ram sexual pheromone: first approach of chemical identification. *Physiol Behav.* 1994;56:955 - 61.
31. **Ungerfeld R.** Socio-sexual signalling and gonadal function, opportunities for reproductive management in domestic ruminants. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;64:207 - 21.
32. **Perkins A, Fitzgerald J.** The behavioral component of the ram effect: the influence of ram sexual behavior on the induction of estrus in anovulatory ewes. *J Anim Sci.* 1994;72:51 - 5.
33. **Gelez H, Fabre-Nys C.** Role of the olfactory systems and importance of learning in the ewes' response to rams or their odors. *Reprod Nutr Dev.* 2006;46:401 - 15.
34. **Findeisen M, Rathmann D, Beck-Sickingher A.** RFamide Peptides: Structure, Function, Mechanisms and Pharmaceutical Potential. *Pharmaceuticals.* 2011;4:1248 - 80.
35. **Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden J, Le Poul E, et al.** The metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor *GPR54*. *J Biol Chem.* 2001;276:34631 - 6.
36. **Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S, et al.** Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:15247 - 52.
37. **Lee J, Miele M, Hicks D, Phillips K, Trent J, Weissman B, et al.** *KiSS-1*, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:1731 - 7.
38. **Hori A, Honda S, Asada M, Ohtaki T, Oda K, Watanabe T, et al.** Metastin suppresses the motility and growth of CHO cells transfected with its receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286:958 - 63.
39. **Parhar I, Ogawa S, Kitahashi T.** RFamide peptides as mediators in environmental control of GnRH neurons. *Prog Neurobiol.* 2012;98:176 - 96.
40. **Wahab F, Shahab M, Behr R.** The involvement of gonadotropin inhibitory hormone and kisspeptin in the metabolic regulation of reproduction. *J Endocrinol.* 2015;225:R49 - 66.
41. **Parhar I, Ogawa S, Ubuka T.** Reproductive Neuroendocrine Pathways of Social Behavior. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:28.
42. **Ogawa S, Nathan F, Parhar I.** Habenular kisspeptin modulates fear in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:3841 - 6.
43. **Ubuka T, Mukai M, Wolfe J, Beverly R, Clegg S, Wang A, et al.** RNA interference of gonadotropin-inhibitory hormone gene induces arousal in songbirds. *PLoS One.* 2012;7(1):e30202.
44. **Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, et al.** A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;275:661 - 7.
45. **Tsutsui K, Ubuka T, Bentley G, Kriegsfeld L.** Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): discovery, progress and prospect. *Gen Comp Endocrinol.* 2012;177:305 - 14.
46. **Satake H, Hisada M, T K, Minakata H, Ukena K, Tsutsui K.** Characterization of a cDNA encoding a novel avian hypothalamic neuropeptide exerting an inhibitory effect on gonadotropin release. *Biochem J.* 2001;354:379 - 85.
47. **Tsutsui K, Ubuka T, Yin H, Osugi T, Ukena K, Bentley G, et al.** Mode of action and functional significance of avian gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): a review. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2006;305:801 - 6.
48. **Ukena K, Tsutsui K.** A new member of the hypothalamic RF-amide peptide family, LPXRF-amide peptides: structure, localization, and function. *Mass Spectrom Rev.* 2005;24:469 - 86.
49. **Kriegsfeld L, Mei D, Bentley G, Ubuka T, Mason A, Inoue K, et al.** Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:2410 - 5.
50. **Tsutsui K, Osugi T.** Evolutionary origin and divergence of GnIH and its homologous peptides. *Gen Comp Endocrinol.* 2009;161:30 - 3.
51. **Tsutsui K.** A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Prog Neurobiol.* 2009;88:76 - 88.
52. **Ubuka T, Morgan K, Pawson A, Osugi T, Chowdhury V, Minakata H, et al.** Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *PLoS One.* 2009;4:e8400.
53. **Tsutsui K, Bentley G, Kriegsfeld L, Osugi T, Seong J, Vaudry H.** Discovery and evolutionary history of gonadotropin-inhibitory hormone and kisspeptin: new key neuropeptides controlling reproduction. *J Neuroendocrinol.* 2010;22:716 - 27.
54. **Ubuka T, Son Y, Bentley G, Millar R, Tsutsui K.** Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), GnIH receptor and cell signaling. *Gen Comp Endocrinol.* 2013;190:10 - 7.
55. **Clarke I, Sari I, Qi Y, Smith J, Parkington H, Ubuka T, et al.** Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology.* 2008;149:5811 - 21.
56. **Ducret E, Anderson G, Herbison A.** RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology.* 2009;150:2799 - 804.
57. **Ubuka T, Son Y, Tobari Y, Tsutsui K.** Gonadotropin-inhibitory hormone action in the brain and pituitary. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;28:148.
58. **Murakami M, Matsuzaki T, Iwasa T, Yasui T, Irahara M, Osugi T, et al.** Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *J Endocrinol.* 2008;199:105 - 12.
59. **Johnson M, Tsutsui K, Fraley G.** Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav.* 2007;51:171 - 80.
60. **Bentley G, Ubuka T, McGuire N, Calisi R, Perfito N, Kriegsfeld L, et al.** Gonadotropin-inhibitory hormone: a multifunctional neuropeptide. *J Neuroendocrinol.* 2009;21:276 - 81.
61. **Sukhbaatar U, Kanasaki H, Mijiddorj T, Oride A, Miyazaki K.** Expression of gonadotropin-inhibitory hormone receptors in mouse pituitary gonadotroph *LβT2* cells and hypothalamic gonadotropin-releasing hormone-producing *GT1-7* cells. *Endocr J.* 2014;61:25 - 34.
62. **Ubuka T, Son Y, Tsutsui K.** Molecular, cellular, morphological, physiological and behavioral aspects of gonadotropin-inhibitory hormone. *Gen Comp Endocrinol.* 2016;227:27 - 50.
63. **Ubuka T, Bentley G, Ukena K, Wingfield J, Tsutsui K.** Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:3052 - 7.

64. **Chowdhury V, Yamamoto K, Ubuka T, Bentley G, Hattori A, Tsutsui K.** Melatonin stimulates the release of gonadotropin-inhibitory hormone by the avian hypothalamus. *Endocrinology*. 2010;151:271 - 80.
65. **Evans J, Anderson G.** Balancing ovulation and anovulation: integration of the reproductive and energy balance axes by neuropeptides. *Hum Reprod Update*. 2012;18:313 - 32.
66. **León S, García-Galiano D, Ruiz-Pino F, Barroso A, Manfredi-Lozano M, Romero-Ruiz A, et al.** Physiological roles of gonadotropin-inhibitory hormone signaling in the control of mammalian reproductive axis: studies in the NPF1 receptor null mouse. *Endocrinology*. 2014;155:2953 - 65.
67. **Ozcan M, Saatci T, A A, Canpolat S, Kelestimur H.** Leptin activates cytosolic calcium responses through protein kinase-C dependent mechanism in immortalized RFamide-related peptide-3 neurons. *Brain Res*. 2015;1601:8 - 14.
68. **Gojska N, Belsham D.** Glucocorticoid receptor-mediated regulation of Rfrp (GnIH) and Gpr147 (GnIH-R) synthesis in immortalized hypothalamic neurons. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;384:23 - 31.
69. **Kim J, Brownjohn P, Dyer B, Beltramo M, Walker C, Hay D, et al.** Anxiogenic and Stressor Effects of the Hypothalamic Neuropeptide RFRP-3 Are Overcome by the NPF1 Antagonist GJ14. *Endocrinology*. 2015;156:4152 - 62.
70. **Chan Y, Broder-Fingert S, Wong K, Seminara S.** Kisspeptin/Gpr54-independent gonadotropin-releasing hormone activity in Kiss1 and Gpr54 mutant mice. *J Neuroendocrinol*. 2009;21:1015 - 23.
71. **Ramaswamy S, Seminara S, Pohl C, DiPietro M, Crowley WJ, Plant T.** Effect of continuous intravenous administration of human metastatin 45-54 on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*. 2007;148:3364 - 70.
72. **de Roux N, Genin E, Carel J, Matsuda F, Chaussain J, Milgrom E.** Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:10972 - 6.
73. **Seminara S, Messager S, Chatzidaki E, Thresher R, Acierno JJ, Shagoury J, et al.** The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 2003;349:1614 - 27.
74. **Millar R, Babwah A.** KISS1R: Hallmarks of an Effective Regulator of the Neuroendocrine Axis. *Neuroendocrinology*. 2015;101:193 - 210.
75. **Szerezewski J, Pampillo M, Ahow M, Offermanns S, Bhattacharya M, Babwah A.** GPR54 regulates ERK1/2 activity and hypothalamic gene expression in a Gα(q/11) and β-arrestin-dependent manner. *PLoS One*. 2010;5(9):e12964.
76. **Lehman M, Merkley C, Coolen L, Goodman R.** Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res*. 2010;1364:90 - 102.
77. **Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath M, Keller E, Caraty A, et al.** The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci*. 2010;31:1984 - 98.
78. **Hrabovszky E.** Neuroanatomy of the human hypothalamic kisspeptin system. *Neuroendocrinology*. 2014;99:33 - 48.
79. **Hrabovszky E, Sipos M, Molnár C, Ciofi P, Borsay B, Gergely P, et al.** Low degree of overlap between kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin immunoreactivities in the infundibular nucleus of young male human subjects challenges the KNDy neuron concept. *Endocrinology*. 2012;153:4978 - 89.
80. **Romero A, Krajewski S, Voytko M, Rance N.** Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:2744 - 50.
81. **Romero A, Rance N.** Changes in prodynorphin gene expression and neuronal morphology in the hypothalamus of postmenopausal women. *J Neuroendocrinol*. 2008;20:1376 - 81.
82. **Rance N, Young W.** Hypertrophy and increased gene expression of neurons containing neurokinin-B and substance-P messenger ribonucleic acids in the hypothalamus of postmenopausal women. *Endocrinology*. 1991;128:2239 - 47.
83. **Darker J, Larminie C, Wilson S, Bergsma D, Emson P, Faull R, et al.** AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem*. 2001;276:28969 - 75.
84. **Clarkson J, Herbison A.** Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2006;147:5817 - 25.
85. **Herbison A.** Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev*. 2008;57:277 - 87.
86. **Cravo R, Margatho L, Osborne-Lawrence S, Donato JJ, Atkin S, Bookout A, et al.** Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience*. 2011;173:37 - 56.
87. **Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, et al.** Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev*. 2007;53:367 - 78.
88. **Adams J, Taylor A, Schoenfeld D, Crowley WJ, Hall J.** The midcycle gonadotropin surge in normal women occurs in the face of an unchanging gonadotropin-releasing hormone pulse frequency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79:858 - 64.
89. **Lehman M, Coolen L, Goodman R.** Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*. 2010;151:3479 - 89.
90. **Murakawa H, Iwata K, Takeshita T, Ozawa H.** Immunoelectron microscopic observation of the subcellular localization of kisspeptin, neurokinin B and dynorphin A in KNDy neurons in the arcuate nucleus of the female rat. *Neurosci Lett*. 2016;612:161 - 6.
91. **Dufourny L, Caraty A, Clarke I, Robinson J, Skinner D.** Progesterone-receptive beta-endorphin and dynorphin B neurons in the arcuate nucleus project to regions of high gonadotropin-releasing hormone neuron density in the ovine preoptic area. *Neuroendocrinology*. 2005;81:139 - 49.
92. **Yen S, Quigley M, Reid R, Ropert J, Cetel N.** Neuroendocrinology of opioid peptides and their role in the control of gonadotropin and prolactin secretion. *Am J Obstet Gynecol*. 1985;152:485 - 93.
93. **Skorupskaitė K, George J, Anderson R.** Role of a neurokinin B receptor antagonist in the regulation of ovarian function in healthy women. *Lancet*. 2015;385(Suppl 1):S92.
94. **Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar R, Tena-Sempere M.** Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 2012;92:1235 - 316.
95. **Navarro V, Castellano J, Fernández-Fernández R, Barreiro M, Roa J, Sanchez-Criado J, et al.** Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology*. 2004;145:4565 - 74.
96. **Shaw N, Histed S, Srouji S, Yang J, Lee H, Hall J.** Estrogen negative feedback on gonadotropin secretion: evidence for a direct pituitary effect in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:1955 - 61.