

Regulación de la expresión y liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH): Los glucocorticoides como inhibidores de la reproducción. Revisión

Nélida Rodríguez MV MS

Fac. de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad de Antioquia, AA. 1226, Medellín, Colombia

(Recibido: 22 febrero, 2000; aceptado: 6 junio, 2000)

Resumen

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) juega un papel central en la regulación de la competencia reproductiva en todos los vertebrados. Este decapeptido producido por unas cuantas células ubicadas en la parte anterior y media del hipotálamo es liberado en forma pulsátil hacia la hipófisis anterior, donde induce la liberación de las gonadotropinas: la hormona folículo-estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). El estrés es un factor que compromete la competencia reproductiva de los animales. Sin embargo, el nivel al cual ocurre esta inhibición y los mecanismos moleculares de esta acción aún no han sido enteramente dilucidados. Recientemente se han encontrado evidencias que involucran a los glucocorticoides como inhibidores de la expresión del gen de la GnRH, pudiendo ser ésta una de las formas en las cuales la reproducción se ve afectada por altas concentraciones de glucocorticoides. Esta revisión presenta el estado actual del conocimiento sobre la GnRH, su estructura molecular, el desarrollo y distribución de las células que la producen, las nuevas herramientas para el estudio de la regulación de su expresión, síntesis y liberación. Se discuten los mecanismos de acción de los glucocorticoides, y su aparente control negativo sobre la expresión y liberación de dicha hormona y por ende sobre la reproducción.

Palabras clave: eje hipotalámico-hipofisario-gonadal, estrés, expresión genética, glucocorticoides, GnRH.

Introducción

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es la primera en la jerarquía de hormonas que regulan los procesos reproductivos en los mamíferos. Debido a que la GnRH es producida por un reducido número de neuronas dispersas en el hipotálamo, el estudio de los mecanismos reguladores de su expresión genética y su liberación se había visto obstaculizado.

El entendimiento de los factores que regulan positiva o negativamente la expresión de la GnRH es de gran importancia para una óptima producción animal

y para la reproducción de especies en cautiverio o en vía de extinción.

Actualmente el establecimiento de líneas celulares que expresan GnRH *in vitro* y los recientes avances en técnicas de biología molecular, permiten un estudio más profundo sobre este péptido.

Altas concentraciones de glucocorticoides, ya sea liberados en condiciones de estrés, presentes en el síndrome de Cushing o administrados clínicamente, tienen un efecto negativo sobre la reproducción. Se han propuesto varios modelos sobre los niveles a los cuales ocurre esta acción y sus mecanismos. Se ha de-

mostrado que los glucocorticoides inhiben directamente la expresión del gen que codifica para la GnRH, causando represión en la transcripción de éste (5,8).

Historia del descubrimiento de la GnRH

La hipófisis, o pituitaria, fue considerada durante mucho tiempo como la “glándula maestra”, ya que la administración de sus extractos tenía la propiedad de alterar virtualmente todos los sistemas y procesos del organismo, incluyendo la reproducción (2).

A partir de 1930, Harris realizó una serie de experimentos que demostraron el control del hipotálamo sobre la hipófisis en la reproducción. Al lesionar la vasculatura portal entre el hipotálamo y la hipófisis, la ovulación se veía interrumpida, pero un extracto hipotalámico inducía de nuevo la ovulación (13,14,15). Esto fue confirmado por Nikitovich-Winer y Everett en 1958 (24). Así surgieron los conceptos del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal y de neuroendocrinología.

En 1971 dos grupos, uno trabajando con extractos hipotalámicos de origen porcino y el otro con material ovino, purificaron y determinaron la secuencia del péptido que inducía la liberación de FSH y de LH, por lo cual se llamó la hormona liberadora de las gonadotropinas, GnRH (3, 30).

Ontogénesis y distribución de las neuronas productoras de GnRH

Las células productoras de la GnRH se originan en el epitelio de la placa olfatoria medial. Posteriormente migran a través del septo nasal junto con ramas del nervio vomeronasal hasta el diencéfalo. La migración de las células productoras de GnRH es un fenómeno universal para todos los vertebrados (27). Una de las formas del síndrome de Kallman (hipogonadismo hipogonadotrópico con anosmia), es causada por un defecto en la migración de estas células y de los nervios olfatorios al hipotálamo.

Una vez en el hipotálamo, las células productoras de GnRH se distribuyen por la región supraquiasmática SQ, en el área preóptica del hipotálamo anterior, POA-AH (31); algunas se dispersan también por el núcleo arcuato AN (figura 1).

El número de células varía de 500 a 2000 según la especie (39). La GnRH también es expresada, aunque en niveles muy bajos, por células de la glándula mamaria, las gónadas, la placenta, el riñón, la próstata y la médula ósea (15,17,25).

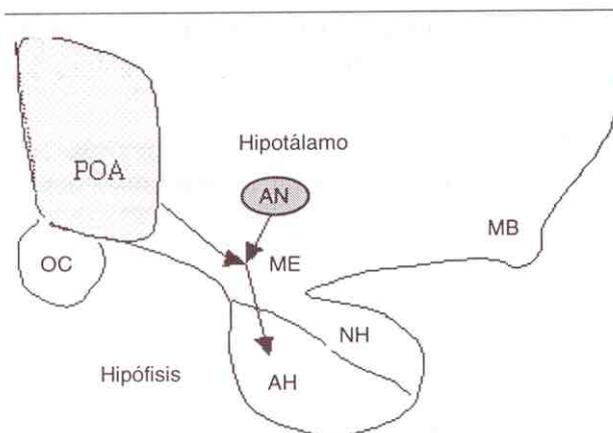


Figura 1. Distribución de las neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo de los mamíferos

Las áreas grises representan las zonas en las cuales se encuentran dispersas las neuronas productoras de GnRH. El decapeptido es transportado por neuroterminales a la eminencia media ME, de donde pasa a la adenohipófisis por la vasculatura portal. OC: quiasma óptico; POA: área preóptica; AN: núcleo arcuato; MB: cuerpo mamar; AH: hipófisis anterior; NH: hipófisis posterior (16).

Interacción de la GnRH con su receptor

La GnRH es liberada en forma pulsátil por neuroterminales de la eminencia media al sistema portal de la hipófisis, por donde es transportada a la hipófisis anterior. Allí interactúa con el receptor para GnRH de las células gonadotrópicas. Éste es un receptor rodopsinoide que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteína G y posee siete dominios transmembranales, de los cuales el tercero posee un residuo ácido que juega un papel clave en la unión con la hormona (11).

Biología molecular de la GnRH

En la década de los ochenta se estableció que la GnRH de ratón, rata y humano presentaban la misma secuencia que la descubierta para cerdo y oveja, y se denominó mGnRH (GnRH de mamífero) o GnRH-I (1,20,32).

Una forma de GnRH, que difería en un aminoácido de mGnRH, fue aislada en 1982 del hipotálamo de gallina y se llamó GnRH-II (22). Dos años más tarde una tercera forma de GnRH fue descubierta en gallina, la GnRH-III (23), la cual difiere en tres aminoácidos de GnRH-I y GnRH-II (tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de las 3 formas más comunes de la GnRH

Forma	Secuencia de aminoácidos
GnRH-I	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-Gly6-Leu7-Arg8-Pro9-Gly10-NH2
GnRH-II	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-Gly6-Leu7-Glu8*-Pro9-Gly10-NH2
GnRH-III	pGlu1-His2-Trp3-Ser4-His5*-Gly6-Trp7*-Tyr8*-Pro9-Gly10-NH2

* Aminoácidos que difieren de la GnRH de mamíferos descubierta en 1971.

En la actualidad se han identificado 10 miembros de la familia de las GnRH en diferentes especies hasta con tres formas presentes simultáneamente en una sola especie. Los aminoácidos en las posiciones 1, 2, 4, 9 y 10 están conservados en todas, lo que podría indicar que éstos jueguen un papel importante en la interacción de la hormona con su receptor (2). Además, el decapeptido contiene un giro entre los aminoácidos 5 y 6 que promueve la interacción entre los extremos N y C, lo cual puede garantizar la protección de la molécula de la degradación enzimática.

El gen de la GnRH-I está localizado en el cromosoma 8p21, mientras que la GnRH-II se encuen-

tra en el 20p13. El gen posee 4 exones, de los cuales el primero no codifica, en el segundo exón se encuentra la información para péptido señal de 21 a 25 aminoácidos, para la GnRH y para la primera parte del péptido asociado a GnRH, GAP. El tercer exón codifica para la porción media de GAP y los últimos aminoácidos de GAP están codificados por el exón 4, junto con una región no codificadora (10). Esto se ilustra con mayor claridad en la figura 2.

La secuencia precursora posee de 89 a 92 aminoácidos según la especie, de los cuales 21 a 23 corresponden al péptido señal, 10 a la GnRH, luego hay una secuencia de Gly-Lys-Arg y finalmente 56 aminoácidos del GAP.

El péptido señal es hidrofóbico y su función parece ser la de facilitar el transporte del decapeptido a través del retículo endoplasmático. En el lugar de clivaje entre el péptido señal y la GnRH, la glutamina, en la posición 1 de la hormona, es ciclada a ácido piroglutámico (2). Nikolics y colaboradores (25) demostraron que el GAP inhibe la liberación de prolactina.

Regulación de la liberación y expresión de la GnRH

Actualmente existen algunas líneas celulares de neuronas hipotalámicas que expresan GnRH en niveles similares a los observados *in vivo*. Éstas constituyen herramientas sumamente útiles para estudiar los mecanismos que regulan la secreción y síntesis de la GnRH.

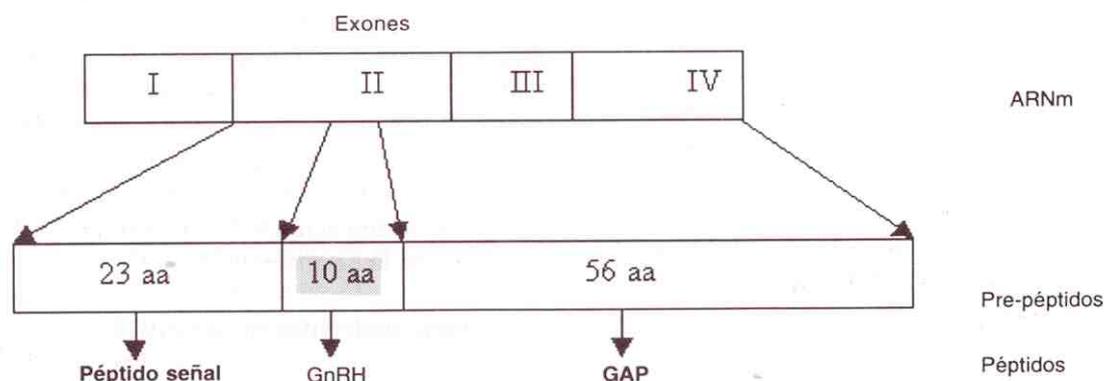


Figura 2. Traducción y procesamiento de la GnRH

En el ARN mensajero el exón I no contiene secuencias codificadoras. El exón II codifica para el péptido señal, para la GnRH y para la primera parte del péptido asociado a GnRH, GAP. El resto del GAP está codificado por los exones III y IV. Adaptado de Dunn y Millan 1998.

En 1990, Mellon y sus colegas establecieron una línea celular (GT1) con neuronas secretoras de GnRH, mediante el uso de tumorigénesis dirigida. Unieron el promotor del gen de GnRH de rata al gen Tag (tumor-antigen) del virus 40 de simio (SV40). Este transgén de 3.1 kilobases (kb) se introdujo en cigotos de ratón. Los animales transgénicos se identificaron mediante Southern blot, con una sonda del gen de GnRH humana y Northern blot, mediante una sonda radioactiva de ARN del gen Tag (21).

Tres líneas de células productoras de GnRH (GN10, GN11, NLT) fueron desarrolladas por Radovick y sus colegas, mediante el mismo procedimiento pero usando el promotor del gen humano de GnRH en vez del gen de rata, obteniendo un transgén de 4 kb (28).

Las células GT1, GN10, GN11 y NLT expresan receptores de glucocorticoides (GR), receptores del factor insulinoide de crecimiento I (IGF-IR) (39), receptores del factor de crecimiento epitelial (EGFR), receptores de estrógeno (ER o OR) (40), receptores del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGFR) (38) y receptores del factor liberador de corticotropinas (CRFR) (36).

Estas líneas celulares se han usado en varios estudios de regulación de GnRH. Radovick y colaboradores (28) estudiaron el papel regulador de las hormonas esteroideas sobre la expresión del gen GnRH. La acción de los glucocorticoides sobre la expresión de GnRH mRNA, fue estudiada por Dunn (8) trabajando con células NLT. Zakaria y otros, usando células NLT (39) condujeron un estudio que demostró la inhibición de la expresión de GnRH, por el éster forbol 12-O-tetradecanoilforbol 13 (TPA). Tsai y Weiner (37) determinaron el efecto neurotrópico del factor de crecimiento fibroblástico básico sobre las células GT1. Zhen y colaboradores (40), estudiaron la regulación de la expresión del gen GnRH por el factor insulinoide de crecimiento I (IFG-1). La regulación de la transcripción de GnRH por péptidos similares al factor liberador de corticotropina (CRF) fue estudiada por Tellman y colaboradores (35).

La regulación de la liberación de GnRH, requiere una serie de mecanismos reguladores complejos, presumiblemente mediados en parte por factores neurotrópicos, y un trastorno en cualquiera de estos mecanismos puede llevar a incompetencia reproductiva. El análisis de los niveles de GnRH en

la circulación hipofisiotrópica, demuestra que desde la pubertad ésta es secretada en forma pulsátil y los intervalos entre pulsos varían, desde 10 minutos hasta 1 hora, según la especie. Los intentos iniciales de usar GnRH en forma terapéutica solo dieron resultado una vez se inició su administración pulsátil (33).

La melatonina tiene efecto sobre la liberación estacional de GnRH debido al fotoperíodo. Se han encontrado sitios inmunoreactivos a melatonina en la eminencia media del hipotálamo (34). Aún no se ha determinado si éstos son sus receptores y no se ha confirmado su expresión específica en las neuronas productoras de GnRH, por lo cual se supone que existe un circuito interneuronal en la eminencia media, del cual hacen parte células dopaminérgicas. Algunos aminoácidos neurotransmisores excitatorios, como el N-metil-D,L ácido aspártico (NMDA) el glutamato y aspartato, también estimulan notoriamente la liberación de GnRH (19).

Contijoch y otros (7) reportaron un aumento en la liberación de la GnRH después de tratamiento con neuropéptido Y (NPY). Además confirmaron la presencia de una alta densidad de terminales liberadoras de NPY en la zona interna de la eminencia media, lo que puede considerarse como una base anatómica para la acción estimuladora del NPY.

La liberación de la GnRH está principalmente afectada por los esteroides gonadales, estrógeno y testosterona, los cuales ejercen control dependiendo del momento del ciclo estral y de su concentración. Un aumento en la producción de estrógeno por las células de la granulosa causa el pico preovulatorio de LH mediante retroalimentación positiva en la liberación de GnRH. Se ha reportado también disminución tónica de la concentración de ARNm de la GnRH después de un tratamiento con altos niveles de estrógenos y testosterona en machos y hembras intactos y castrados tanto en mamíferos (6) como en aves (9,32). Altas concentraciones de progesterona también inhiben la liberación de GnRH y consecuentemente la de LH.

Los péptidos opiáceos ejercen un papel inhibitorio sobre la liberación de la hormona GnRH. La endorfina β disminuye su liberación y su antagonista, la naloxona, lo estimula. Aún no existe evidencia de contacto sináptico entre neuronas productoras de opiáceos y las de GnRH, pero este efecto puede ser mediado por neuronas intermediadoras (11).

Inhibición de la expresión del gen de la GnRH por parte de los glucocorticoides

Los glucocorticoides son también llamados corticoesteroides, por ser hormonas esteroideas producidas por la corteza adrenal. En la mayoría de los mamíferos el principal glucocorticoide es el cortisol, también conocido como hidrocortisona, mientras que en los roedores es la corticosterona (36).

Los glucocorticoides estimulan diferentes procesos que colectivamente sirven para mantener concentraciones normales de glucosa en plasma. Poseen actividad antiinflamatoria, e inmunosupresora, a través de las cuales juegan un papel importante en la protección del organismo contra el efecto de factores generadores de estrés. Los glucocorticoides siempre están presentes en niveles basales, con variaciones diurnas. El estrés produce un incremento en su concentración plasmática.

En el citoplasma, el cortisol se une al receptor de glucocorticoides (GR) y el complejo hormona-receptor es transferido al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción y se une al elemento de respuesta a los glucocorticoides (GRE), o al elemento negativo de respuesta a los glucocorticoides (nGRE) dependiendo de cual esté presente en el promotor de un gen dado, activando o inhibiendo la transcripción respectivamente (18) como se aprecia en la figura 3.

La concentración alta de glucocorticoides en la circulación general tiene un efecto negativo sobre la función reproductiva ya que inhiben la producción de GnRH, LH, estradiol y testosterona. Este es uno de los posibles mecanismos por medio de los cuales el

calor, el estrés nutricional y de manejo disminuyen la competencia reproductiva de los animales de producción y de especies silvestres en cautiverio.

La presencia de glucocorticoides durante 24 horas en el medio de cultivo de células GT1, causó una disminución del 59% en la concentración de ARNm de GnRH (5). Utilizando células NLT, Dunn y otros (8) reportaron una reducción de tres veces en la expresión de GnRH después de 24 horas de tratamiento con dexametasona, agonista sintético tipo II del cortisol.

Calogero y su grupo (4) estudiaron los efectos de glucocorticoides en la liberación de GnRH, usando hipotálamos individuales extraídos de ratas machos. En este estudio tanto la corticoesterona como la dexametasona disminuyeron los niveles basales de GnRH en una proporción dependiente de la concentración. Encontraron además que, con concentraciones fisiológicas de corticosterona ($1 \times 10^{-8} \text{M}$), la progesterona adicionada al medio contrarrestaba el efecto inhibitorio del glucocorticoide, pero que este efecto se perdía con concentraciones más altas del cocorticoides ($1 \times 10^{-6} \text{M}$).

Esto podría deberse a una competencia por los receptores para glucocorticoides por parte de la progesterona o podría especularse que tal vez la progesterona cumple un papel "amortiguador" del efecto inhibitorio de los glucocorticoides sobre el eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal en condiciones normales, pero que pierde esta habilidad en condiciones de estrés, síndrome de Cushing o concentraciones iatrogénicas elevadas de glucocorticoides.

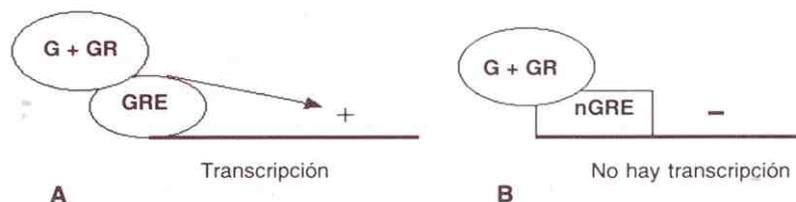


Figura 3. Regulación de la expresión genética por parte de los glucocorticoides

El glucocorticoide acoplado a su receptor (G+GR), se une al elemento de respuesta presente en el promotor del gen. Cuando el elemento de respuesta es positivo (GRE), la transcripción se activa, (A). Si el elemento de respuesta es negativo (nGRE), la transcripción es inhibida (B).

Conclusiones y perspectivas en la regulación de la GnRH

Si bien las líneas de células productoras de GnRH constituyen una herramienta útil para el estudio de la regulación de la expresión, síntesis y liberación de dicha hormona, y en sus 9 años de vida han permitido el entendimiento de procesos de regulación en la transcripción, que antes por la escasez y dispersión de las células no eran posibles, éstas no se deberían considerar como sustitutos totales del estudio en vivo, ya que en el proceso de inmortalización la expresión genética puede verse afectada.

La habilidad de los glucocorticoides para inhibir la expresión del gen de la GnRH y su liberación sugiere que esta hormona relacionada con el estrés no solo actúa a nivel hipofisiario, inhibiendo la liberación de LH y FSH, sino también a nivel hipotalámico disminuyendo la función reproductiva desde estos dos niveles. Se ha demostrado que el factor liberador de

corticotropinas (CRF) también inhibe la expresión de GnRH (35). Esto puede interpretarse como una vía alternativa para inhibición de la función reproductiva en condiciones de estrés.

Un estudio más detenido sobre la acción conjunta de los glucocorticoides y la progesterona en la regulación de la expresión y liberación de GnRH permitiría esclarecer su posible función en el control del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal. El conocimiento adquirido a partir de estudios sobre el control primario de la reproducción servirá para formular mecanismos para manipular el sistema reproductivo mejorando la fertilidad de los animales y previniendo trastornos reproductivos de origen hormonal. El entendimiento sobre la estructura del receptor de GnRH y la forma en que éste y la hormona interactúan, facilitará el desarrollo de modelos que permitan el diseño de nuevos agonistas de la hormona para su uso clínico en el tratamiento de desórdenes reproductivos, o para el diseño de anticonceptivos.

Summary

Expression and release regulation of gonadotropin releasing hormone (GnRH): Glucocorticoids like reproduction inhibitor

Gonadotropin releasing hormone (GnRH) plays a key role in regulation of the reproductive competence in vertebrates. This decapeptide produced by a few cells in the anterior and medial hypothalamus is released in a pulsatile manner onto the pituitary, where it induces the secretion of gonadotropins: follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH). Stress negatively affects reproductive competence in animals. However, the level of this inhibition and its molecular mechanisms are not completely understood. Recent evidence that glucocorticoids inhibit GnRH gene expression suggest that it could be one of the forms by which high glucocorticoid concentrations affect reproduction. This review presents the current knowledge about GnRH and its molecular structure, the ontogenesis and distribution of the cells that produce this hormone, new tools that facilitate the study of gene expression, synthesis and release of GnRH. The mechanisms of action of glucocorticoids are discussed as well as their negative regulation on the expression and release of GnRH and consequently on reproduction.

Key words: gene expression, glucocorticoids, GnRH, hipotálamic-pituitary-gonadal axis, stress.

Referencias

- Adelman JP, Mason AJ, Hayflick JC, Seeburg PH. Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. Proc Nat Ac Sc USA. 1986; 83:179-184.
- Bond C, Adelman JP. Advances in gonadotropin-releasing hormone. En: Gwatkin R. (ed). Genes in mammalian reproduction, London, Wiley-Liss Inc, 1993; 229-245.
- Burgus R, Butcher M, Ling N, Monahan M, et al. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinising hormone-releasing hormone. Proc Nat Ac Sc USA. 1972; 69: 278-283.
- Calogero AE, Burrello N, Bosboom AMJ, Garofalo MR, Weber RFA, Dagata R J. Glucocorticoids inhibit gonadotropin-releasing hormone by acting directly at the hypothalamic level. Endocrinol Investigation 1999; 22(9):666-670.

5. Chandran UR, Attardi B, Friedman R, Dong K-W, Roberts J, DeFranco D. Glucocorticoid receptor-mediated repression of the GnRH promoter activity in GT1 hypothalamic cell lines. *Endocrinology* 1994; 134:1467-1474.
6. Clarke IJ. Control of GnRH secretion. *J Reprod Fert* 1987; 34(Supp):1-8.
7. Contijoch AM, Malamed S, McDonald JK, Advis JP. Neuropeptide-Y regulation of GnRH release in the median eminence. *Neuroendocrinol* 1993; 57:135-138.
8. Dunn IC, Wolfe AM., Radovick S. The regulation of GnRH mRNA levels by Dexamethasone in a clonal neuronal cell line. Program and Abstracts of the 77th Annual Meeting of The Endocrine Society 1995; June 14-17 Washington, DC. 549.
9. Dunn IC. Is oestrogen necessary for the maturation of the photoperiodic response in poultry? *Br Poult Sci* 1997; 38:653-657.
10. Dunn IC, Millan JR, GnRH: forms and functions in birds. *Poultry and Avian Biol Rev* 1998; 9:167-171.
11. Flanagan CA, Millar RP, Illing N. Advances in understanding gonadotrophin-releasing hormone receptor structure and ligand interactions. *Rev Reprod* 1997; 2(2):113-120
12. Green JD, Harris GW. Neurovascular link between neurohypophysis and adenohypophysis. *J Endocr* 1947; 5:136-143.
13. Harris GW. Induction of ovulation in the rabbit by electrical stimulation of the hypothalamo-hypophyseal mechanism. *Proc Roy Soc* 1937; 122:374-382.
14. Harris GW. Oestrous rhythm, pseudopregnancy and the pituitary stalk in the rat. *J Phys* 1950; 111:347-360.
15. Harris N, Dutlow C, Eidne K, Dong K-W, Robers J et al. GnRH gene expression in MDA-MB-231 and ZR-75-1 breast carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1991; 51:2577-2581.
16. Karsch FJ. The Hypothalamus and Anterior Pituitary Gland. En: Austin CR. (ed). *Hormonal control of reproduction*, 2ed, London, Academic Press, 1984; 99-121.
17. Kelly AC, Rodgers A, Dong K-W, Barrezaeta NX, Blum M et al. GnRH and chorionic gonadotropin gene expression in human placental development. *DNA Cell Biol* 1991; 10:411-421.
18. Latchman DS. *Eukaryotic Transcription Factors*. 3rd edition. London. Academic Press 1998; 97-109.
19. Malpoux B, Viguié C, Skinner DC, Thiéry JC, Pelletier J. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Animal Reprod Science* 1996; 42:109-117.
20. Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young WS, et al. A deletion truncating the GnRH gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* 1986; 234:1366-1370.
21. Mellon PL, Widle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI.. *Immortalisation of Hypothalamic GnRH Neurones by Genetically Targeted Tumorigenesis*. *Neuron* 1990; 5:1-10.
22. Miyamoto K, Hasegawa Y, Minegishi T, Nomura M, et al. Isolation and characterization of chicken hypothalamic luteinising hormone releasing hormone. *Biochem Biophys Res Com* 1982; 107:820-823.
23. Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, et al. Identification of the second form of gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus; evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin releasing hormones in avian species. *Proc Nat Ac Sc USA*. 1984; 81:3874-3878.
24. Nikitovich-Winer M, Everett JW. Functional restitution of pituitary grafts retransplanted from kidney to median eminence. *Endocr* 1958; 63:916-927.
25. Nikolics K, Mason AJ, Szony E, Ramachandran J, Seeburg PH. A prolactin inhibiting factor within the precursor for human GnRH. *Nature* 1985; 316:511-517.
26. Pfaff DW, Schwanzel-Fukuda M. Development of GnRH neurones important for the onset of reproductive endocrine and behavioral functions. En: Plant T, Lee P (eds). *The Neurobiology of Puberty*; London, The Soc for Endocr. 1995; 3-13.
27. Radovick S, Wray S, Lee E, Nicols K, Nakayama Y et al. Migratory arrest of Gonadotrophin-Releasing hormone neurons in transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Science USA 1991; 88:3402-3406.
28. Radovick S, Wray S, Muglia L.. *Steroid Hormone Regulation and Tissue- Specific Expression of the Human GnRH gene in cell Culture and transgenic animals*. *Hormones and Behaviour* 1994; 28:520-529.
29. Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba W et al. Gonadotrophin releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinising and follicle stimulating hormones. *Science* 1971; 173:1036-1040.
30. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of Luteinising Hormone-Releasing hormone neurones. *Nature* 1989; 338:161-164.
31. Seeburg PH, Adelman JP. Characterisation of cDNA for precursor of human luteinising hormone releasing hormone. *Nature* 1984; 311:666-669.
32. Sharp PJ, Dunn IC, Sang HM, Mess A, Gladwell RT. Inhibitory effects of steroids on GnRH-I mRNA and neurone numbers. *Neuroendocrinol* 1994; 60(supp 1): 26-30.
33. Southworth MB, Matsumoto AM, Gross KM. The importance of signal pattern in the transmission of endocrine information: Pituitary gonadotropin responses to continuous and pulsatile GnRH. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72:1286-1289.
34. Tamarkin L, Caird CJ, Almeida OFX. Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science* 1985; 227:714-720.
35. Tellam DJ, Perone MJ, Dunn IC. Direct regulation of GnRH transcription by CRF-like peptides in an immortalized Neuronal cell line. *NeuroReport* 1998; 9:3135-3140.
36. Toates F. *Stress: conceptual and biological aspects*, London, John Wiley and Sons, 1985; 32-53.
37. Tsai P-S, Weiner RI. Regulation of GnRH neurons by basic fibroblast growth factor. *Trends Endocrinol Metab* 1996; 7:65-68.
38. Wierman ME, Fang Z, Kepa JK. GnRH gene expression in neuronal cell lines. *Trends Endocrinol Metab* 1996; 7:60-65.
39. Zakaria M, Dunn IC, Zhen S, Su E, Smith E, Patriquin E, Radovick S. Phorbol Ester regulation of the gonadotrophin-releasing hormone gene in GnRH-secreting cell lines: A molecular basis for species differences. *Molecular Endocrinology* 1996; 10:1282-1291.
40. Zhen S, Zakaria M, Wolfe A Radovick S. Regulation of GnRH gene expression by insulin-like growth factor I in a cultured GnRH-expressing neuronal cell line. *Molecular Endocrinology* 1997; 11:1145-1155.