

Antología de los primeros estudios clínicos con hormonas hipotalámicas: relato de una exitosa colaboración internacional*

Andrew V. Schally,** Carlos Gual***

Resumen

Se revisaron nuestros ensayos clínicos iniciales, efectuados en México por primera vez, con hormona liberadora de tirotropina (TRH) y con hormona liberadora de hormona luteinizante (LH-RH) también conocida como hormona liberadora de gonadotropinas (Gn-RH), tanto naturales como sintéticas. La administración de TRH altamente purificado de origen porcino, ocasionó en cretinos hipotiroideos un aumento en la secreción de tirotropina (TSH). En estudios subsecuentes con TRH sintético también se produjo un aumento significativo de TSH plasmático, tanto en hombres y mujeres normales, como en pacientes con hipotiroidismo primario y otros trastornos endocrinológicos. También se efectuaron estudios clínicos con LH-RH de origen porcino altamente purificado. Todos los sujetos con niveles basales normales de gonadotropinas en el suero, niveles bajos (hombres y mujeres pre-tratados con esteroides) o niveles elevados (v.g. mujeres posmenopáusicas), respondieron al LH-RH con liberación de LH y FSH. Los resultados de estos primeros estudios con LH-RH natural, fueron ratificados con el uso de LH-RH sintético. Estos estudios efectuados en México con TRH y LH-RH precedieron por un amplio margen a otros estudios similares. Más tarde también se efectuaron diversas investigaciones clínicas con agonistas y antagonistas de LH-RH. Se concluye que estas primeras investigaciones jugaron un papel importante para la introducción de las hormonas liberadoras hipotalámicas a la medicina clínica.

Palabras clave: Hormonas hipotalámicas liberadoras, TRH, LH-RH, análogos de LH-RH, ensayos clínicos.

Summary

Our early pioneering clinical trials in Mexico with natural and synthetic thyrotropin-releasing hormone (TRH) and luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) also known as gonadotropin releasing hormone (Gn-RH), were reviewed. Highly purified TRH of porcine origin was shown to stimulate Thyrotropin (TSH) release in hypothyroid cretins. Subsequent tests with synthetic TRH also demonstrated significant increases in plasma TSH in normal men and women as well as in patients with primary hypothyroidism and other endocrine disorders. Even more extensive clinical studies were carried out with highly purified natural porcine LH-RH. Subjects with normal basal serum levels of gonadotropins, low levels (men and women pretreated with steroids) and high levels (e.g. post menopausal women) all responded to LH-RH with a release of LH and FSH. The results of these early studies with the natural LH-RH were confirmed by the use of synthetic LH-RH. These investigations made in Mexico with TRH and LH-RH preceded all other clinical studies by a wide margin. Subsequently various clinical investigations with LH-RH agonists and antagonists were also carried out. All these studies played a major role in introducing hypothalamic-releasing hormones into clinical medicine.

Key words: Hypothalamic-releasing hormones, TRH, LH-RH, LH-RH analogs, clinical trials.

* Reimpreso de *The Endocrinologist*, Vol.11, No. 5, páginas 341-349, y traducido al español con algunas modificaciones. Copyright 2001, Lippincott, Williams and Wilkins, con permiso del Editor.

** Endocrine, Polypeptide and Cancer Institute, Veterans Affairs Medical Center, and Department of Medicine, Tulane University School of Medicine, New Orleans Louisiana 70112.

*** Académico Titular. Academia Nacional de Medicina y Ex-Investigador del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Andrew V. Schally, VA Medical Center, Room 7F109. 1601 Perdido St., New Orleans, LA 70112, USA, Tel: (504) 589-5320; Fax: (504) 566-1625, o a: Dr. Carlos Gual, San Buenaventura 620, Club de Golf México. C.P. 14620, México D.F. Tel: (52) 55-55-73-9220; Fax: (52) 55-56-55-6106.

Introducción

Uno de los mayores descubrimientos en la historia de la endocrinología fue la demostración hace ya tres décadas, de la existencia de hormonas hipotalámicas, o factores liberadores. Tanto la hormona liberadora de tirotropina (TRH) como la hormona liberadora de hormona luteinizante (LH-RH), también conocida como hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), fueron aisladas y caracterizadas químicamente a finales de la década de los sesenta y a principios de los setenta. Sin embargo, es poco conocido que las primeras pruebas clínicas en humanos con TRH y LH-RH naturales y sintéticos, fueron realizadas en México entre 1968 y 1972, como resultado de una estrecha colaboración entre los autores (AVS y CG). Éstas primeras investigaciones con TRH y LH-RH y posteriormente con análogos de LH-RH, desempeñaron un papel muy destacado para su introducción a la medicina clínica. A pesar de que en la actualidad el TRH ya sólo se usa en algunos casos especiales, durante algunos años fue el “estándar de oro”, para valorar el hipertiroidismo. Por otro lado, tanto el LH-RH, como sus agonistas, antagonistas y análogos citotóxicos, están perfectamente bien documentados o bien están en vías de investigación como agentes terapéuticos de importancia en ginecología, oncología y urología.¹⁻⁵ En nuestro papel de responsables de estos proyectos clínicos tanto en los E.U.A. (AVS), como en México (CG), así como en el aislamiento y síntesis de LH-RH (AVS);⁶⁻⁹ intentaremos hacer un relato histórico de estos eventos.

Primeros años y contactos iniciales

A principios de la década de 1950 la idea de que el cerebro afectaba en alguna forma la secreción de hormonas de la hipófisis anterior tenía ya visos de certeza y por lo tanto se puso una mayor atención sobre el hipotálamo y su conexión vascular con la pituitaria. Varios grupos de investigadores trataron de encontrar e identificar las hormonas hipotalámicas previamente postuladas y pusieron inicialmente su atención en el factor hipotético que estimulaba la liberación de ACTH, que fue escogido debido a que el stress ocasionaba secreción de cortisol y a

que este efecto parecía ser mediado a través del sistema nervioso central. Al principio se tuvo un éxito parcial, particularmente por la demostración de que en efecto existía un factor u hormona liberadora de corticotropina (CRF o CRH). Sin embargo el aislamiento y demostración de su naturaleza química fue difícil de alcanzar,¹⁰ así como para cualquier otra hormona hipotalámica. La década comprendida entre los años de 1957 a 1967, fue descorazonadora para los investigadores involucrados, ya que el fracaso para identificar el CRH o cualquier otra hormona hipotalámica, arrojaba dudas sobre la validez de los hallazgos iniciales, de aquéllos incluyendo a AVS, que estaban convencidos de su presencia. AVS y otros que trabajaban en esta área fueron motivo de ironía y escepticismo y aun de ridículo, de numerosos científicos y médicos endocrinólogos norteamericanos, que parecían no darse cuenta de los grandes problemas tecnológicos involucrados en esta tarea. La evidencia de las hormonas hipotalámicas se veía solamente como circunstancial e hipotética y aun fueron comparadas con el monstruo de Loch Ness o como el abominable hombre de nieve del Himalaya y así se planteó la posibilidad de que no fueran más que pálidas ilusiones.¹¹ Al final de la década de los 60, el escepticismo alcanzó un punto en el cual el NIH (Institutos Nacionales de Salud), que había financiado una gran parte del trabajo realizado hasta esa fecha, consideró el suprimir su apoyo y casi lo hizo en 1969. Las consecuencias de esa decisión hubieran sido desastrosas, aunque afortunadamente para AVS el Departamento de Asuntos para Veteranos (VA) nunca vaciló en apoyar sus investigaciones.

A pesar del ambiente negativo, en la década de 1960 se hicieron progresos firmes, aunque con reveses ocasionales. En los laboratorios tanto de AVS¹² como en los de Roger Guillemin, atacaron el problema obteniendo cientos de miles de hipotálamos de animales domésticos necesarios para purificar en forma realista cantidades útiles de hormonas hipotalámicas, con lo cual se mejoraron los procedimientos de purificación y de ensayo. Ya a mediados de los años 60, AVS había obtenido pequeñas cantidades de materiales biológicamente activos para estimular la liberación de TSH o LH, aunque la estructura de estos materiales todavía se resistía a su elucidación.

Sin embargo no todo fue pesimismo en la década de 1960. Resultó muy estimulante que investigadores de USA y del extranjero, apreciaran el potencial científico y terapéutico de las hormonas hipotalámicas. Fue precisamente en esa época en que nos conocimos (AVS y CG) durante la celebración del Sexto Congreso Panamericano de Endocrinología que tuvo lugar en la Ciudad de México en octubre de 1965. En ese evento CG actuaba como el Secretario General del Congreso y también como Jefe del Departamento de Endocrinología, así como director de la Clínica de Estudios en Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición (INN) de México. CG recibió en la década de 1950, su entrenamiento en endocrinología, incluyendo dos años de estudios de posgrado en bioquímica de esteroides en la Worcester Foundation for Experimental Biology. A mediados de los años sesenta, estudiaba en mujeres la regulación de la fertilidad, incluyendo el uso de anovulatorios y estudios metabólicos con progestinas anticonceptivas.

En esa misma época, AVS actuaba como Investigador Titular en el Hospital VA en Nueva Orleans, LA. y era además desde años atrás, Profesor de Medicina en la Escuela de Medicina de la Universidad de Tulane. Después de discutir algunos problemas comunes durante alguna de las sesiones del Congreso, CG invitó a AVS y a sus asociados, a colaborar en el INN para la investigación clínica de hormonas hipotalámicas, una vez que éstas estuvieran disponibles. AVS agradeció esta invitación porque ésta le llegó en una época en que las hormonas hipotalámicas todavía no eran bien conocidas y también porque implicaba confianza de parte de CG en la presencia de hormonas hipotalámicas, ya que en ese tiempo, pocos clínicos en los Estados Unidos creían en su existencia. La Oficina Central de la Administración de Veteranos (VA) también apoyó con firmeza nuestra decisión de 1965 de efectuar ensayos clínicos, pero no fue sino hasta 1967 para TRH y 1968 para LH-RH en que (AVS) terminó la purificación en sus laboratorios de Nueva Orleans una preparación de hipotálamos de porcino, suficiente para realizar estudios clínicos en el humano. Ya para 1968, durante la celebración del Tercer Congreso Internacional de Endocrinología que se celebraba en México (fines de junio y

principios de julio de ese mismo año y en donde CG era nuevamente el organizador); nuestros estudios clínicos estaban en pleno desarrollo.

TRH

Durante todos los años de la década de 1960, AVS en Nueva Orleans dedicó un gran esfuerzo al TRH, acompañado por Cy Bowers en la Universidad de Tulane y por Tommie Redding. Alrededor de 1966, AVS y sus colaboradores ya habían purificado suficiente TRH de origen porcino y así demostraron que éste contenía tres aminoácidos, a saber: ácido glutámico, histidina y prolina.^{12,13} Durante los siguientes tres años, AVS y Cy Bowers con la ayuda de químicos expertos en estructuras del grupo de Karl Folkers, pudieron identificar la estructura del TRH porcino como pGlu-His-Pro-NH₂.¹⁴⁻¹⁸ Aproximadamente al mismo tiempo, Guillemin y sus colaboradores, también resolvieron la estructura del TRH ovino.^{19,20}

Sin embargo, mucho antes de completar la identificación de la estructura del TRH y de efectuar su síntesis, pensamos que era muy importante demostrar que el TRH aislado de hipotálamos porcinos, era activo o no en el hombre. En el caso de que no lo fuera, y si por ejemplo el TRH tuviera la misma especificidad de especie de la hormona de crecimiento, entonces hubiera sido necesario aislar TRH de origen humano y en esa época esto hubiera sido una tarea imposible de realizar. Por este motivo CG y AVS apresuraron su colaboración. Para efectuar estos estudios, tuvimos la fortuna de contar con la colaboración de Cy Bowers, quien era un distinguido endocrinólogo, especialista en tiroides. Analizamos el contenido de TSH en el plasma tanto por bioensayo como por radioinmunoanálisis -ensayo que entonces no era fácil de realizar- este último por cortesía de otro de nuestros colaboradores, Al Parlow de UCLA.

Después de que CG obtuvo en México el consentimiento por escrito de los padres de los pacientes en estudio, se inyectó en tres niños cretinos hipotiroideos, una preparación altamente purificada de TRH de origen porcino. Veinticuatro horas antes de la inyección de TRH, se administró por vía oral, una dosis baja de T₃ con el objeto de disminuir los niveles elevados de TSH plasmático.

cos. Como consecuencia, se observó un aumento significativo de TSH en los primeros 3 minutos, con un máximo entre los 15 y 30 minutos y un descenso gradual en los siguientes 120 minutos. En el caso con la mayor respuesta se observó a los 30 minutos un aumento de 400 % sobre los niveles basales de TSH. En esta forma, de hecho demostramos que un extracto altamente purificado de TRH porcino, era capaz de estimular en el hombre, la liberación de TSH, evidenciado tanto por bioensayo como por radioinmunoanálisis. A mayor abundamiento, estos resultados, así como otros estudios realizados en ratas; demostraron que el TRH de origen porcino no tenía especificidad de especies y que, por supuesto, nuestra colaboración había tenido un gran éxito. Este estudio clínico, es el único registrado con TRH natural y fue publicado en 1968²¹ (ver "Clásicos" en este mismo número de *The Endocrinologist*).

La colaboración continuó después de que obtuvimos TRH sintético y así estudiamos sus efectos en el hombre normal.^{22,23} Con este fin se tomaron muestras de sangre con varios intervalos durante un período de 3 horas y después de una inyección rápida intravenosa de 100-800 µg de TRH sintético. Se practicaron determinaciones de los niveles en el suero de TSH, FSH, LH y GH, por otro colaborador, Don Schalch de la Universidad de Rochester.

Nuevamente los niveles de TSH en el suero se elevaron después de la inyección de TRH en proporción a la dosis administrada, con los niveles más elevados de TSH a los 30 minutos. El tratamiento previo a los pacientes con T_3 , administrado de 5 a 7 horas antes de la inyección de TRH, inhibió parcial o completamente la respuesta al TRH. En la mayoría de los hombres, los niveles de GH, LH y FSH, no cambiaron significativamente. Estos resultados probaron que el TRH sintético, en forma semejante al TRH natural, es activo en el hombre y que sus efectos sobre los niveles de TSH en el suero son relativamente específicos. También demostramos que en mujeres, el TRH induce aún mayores aumentos en los niveles de TSH, que en los hombres.²³ Estas investigaciones fueron completadas en 1969 y los manuscritos enviados para su publicación en 1970, aunque uno de ellos no apareció sino hasta 1971.

Es así, como nuestra colaboración en México demostró por primera vez que el TRH natural y sintético, aumenta significativamente en el humano los niveles de TSH en el plasma, con un efecto mínimo sobre los niveles de LH, FSH y hormona de crecimiento. Estos estudios efectuados con TRH sintético en hombres y mujeres normales, así como en pacientes con hipotiroidismo primario, acromegalia, síndrome de Nelson y tumores hipofisarios, además de los efectos del TRH por vía oral y la ausencia de respuesta en pacientes hipertiroideos o sujetos tratados previamente con T_3 o T_4 , fueron presentados en detalle por CG en septiembre de 1971 durante las Conferencias Laurentianas de Hormonas en Mont Tremblant, Quebec, Canadá.²⁴ En base de estos estudios, sugerimos que el TRH, usado como prueba diagnóstica ya sea solo o combinado con LH-RH (para entonces AVS y sus colaboradores ya habían establecido la estructura del LH-RH; ver más adelante); podría ser no sólo clínicamente útil, sino también un recurso para conocer mejor la fisiología hipotálamo-hipofisiaria. Poco después, nuevas investigaciones confirmaron la utilidad diagnóstica del TRH.²⁵ Desde luego, otros grupos, generalmente después de que habíamos completado nuestros primeros estudios, demostraron en el mismo año de 1970 los efectos del TRH en el humano.²⁶⁻²⁹ Más tarde, otros grupos demostraron que además de TSH, el TRH también liberaba prolactina.^{30,31}

LH-RH

La elucidación de la estructura del TRH prácticamente hizo desaparecer todo el escepticismo que rodeaba a las hormonas hipotalámicas. Fue así como AVS y sus colegas pudieron dedicarle más tiempo al problema de LH-RH y rápidamente pudieron obtener preparaciones de LH-RH natural de gran potencia, cuya actividad se demostró en pruebas efectuadas tanto *in vitro*, como *in vivo*. En vista del éxito obtenido en los estudios clínicos con TRH, pensamos (AVS y CG) que deberíamos ensayar en el humano preparaciones de LH-RH porcino altamente purificadas.

Tuvimos la suerte de que en 1964 Abba Kastin se asoció con AVS, fundamentalmente para continuar sus investigaciones con MSH. Debido a que

también era un clínico consumado, a fines de la década de 1960, le invitamos y él aceptó, unirse a los estudios clínicos con LH-RH. Él era un muy eficiente colaborador y realmente su presencia fue de una gran ayuda para llevar a cabo la mayoría de los estudios efectuados con LH-RH. También colaboramos con Rees Midgley y más tarde con Don Schalch, quienes efectuaron los radioinmunoanálisis de LH y FSH.

El aspecto crucial en este primer estudio efectuado nuevamente en la Ciudad de México y publicado en 1969,³² fue el conocer si el LH-RH de origen porcino ocasionaría liberación de LH en el humano, tal y como se planteó previamente con el TRH, y específicamente establecer si el LH-RH presentaba o no, especificidad de especies. El LH-RH natural porcino utilizado, fue purificado a partir de tejido hipotalámico porcino.⁷ Éste procedimiento implicó procedimientos de extracción con ácido acético, filtración en gel en columnas de Sephadex G-25, concentración con fenol y separación de otros materiales mediante el uso de cromatografía y recromatografía en columnas de carboximetil celulosa, electroforesis de flujo libre y distribución de contracorriente.^{7,12} Ensayos practicados más tarde, demostraron en retrospectiva que esta preparación tenía, cuando menos en la rata, alrededor de 1/10 de la potencia de preparaciones de LH-RH altamente purificado o del material sintético.⁷ A pesar de que el material extraído era escaso, pensamos que éste sería suficiente para efectuar una serie de estudios clínicos (en todos los estudios tanto con LH-RH natural o sintético, obtuvimos un informe consentido por escrito, inyectamos el LH-RH por vía endovenosa, obtuvimos muestras de sangre a intervalos de tiempo variables y determinamos los valores de LH y FSH por medio de radioinmunoanálisis. Ninguno de los sujetos participantes presentó efectos colaterales).

Primero investigamos si el sexo o el tratamiento previo con esteroides femeninos, afectaba la respuesta al LH-RH. Se inyectó LH-RH en dos hombres y dos mujeres sin tratamiento alguno, dos hombres tratados previamente con etinilestradiol y dos mujeres pretratadas con un anticonceptivo oral. Como procedimiento de control se inyectó lisina-vasopresina. El resultado fue bien definido: tanto en hombres como en mujeres, el LH-RH causó un aumento muy significativo del

LH en el suero y significativo en el del FSH. La liberación máxima de gonadotropinas, se presentó aproximadamente a los 24 minutos después de la inyección. El tratamiento previo con esteroides no interfirió con la respuesta al LH-RH, lo cual sugirió que el sitio principal del efecto negativo de retroalimentación, se presenta a nivel del hipotálamo o más alto en el sistema nervioso central. Este estudio fue una clara demostración de que el LH-RH de origen animal, liberaba en el humano LH y FSH y que por lo tanto no tenía especificidad de especies.³² Otros investigadores encontraron aproximadamente al mismo tiempo, efectos similares del LH-RH, pero las preparaciones hipotalámicas utilizadas eran más crudas y la importancia de estos informes eran poco precisos y en particular en lo referente al LH-RH.^{33,34}

En un segundo estudio, publicado al año siguiente, estudiamos otras variables y en éste incluimos 12 sujetos de los cuales 8 eran mujeres. En forma semejante al primer estudio, el LH en el suero de dos mujeres normales aumentaron a más de 250% después de la administración de LH-RH y los niveles de FSH se duplicaron.³⁵ En mujeres con amenorrea secundaria así como en posmenopáusicas, también se obtuvo una respuesta al LH-RH, liberando LH y FSH, aunque en el último grupo los valores basales eran más elevados que en las mujeres premenopáusicas. La respuesta en las mujeres posmenopáusicas persistió aun cuando los niveles elevados de gonadotropinas habían sido inhibidos con un anticonceptivo oral. En hombres normales, el LH-RH fue activo cuando se inyectó tanto por vía subcutánea como por vía endovenosa. Por lo tanto en este segundo estudio confirmamos nuestras observaciones iniciales con LH-RH y las ampliamos a pacientes con niveles elevados de gonadotropinas.

En nuestro tercer estudio realizado en México, todavía con LH-RH natural, administramos LH-RH en seis hombres después de un tratamiento previo durante 1 a 2 semanas, con el compuesto antiestrogénico conocido con el nombre de Clomifén, que por lo general se usa para inducir la ovulación en la mujer. Este producto indujo niveles elevados tanto de LH como de FSH, presumiblemente debido en parte al bloqueo del efecto negativo de retroalimentación de los estrógenos endógenos a nivel hipotalámico. En esta situación, la inyección de LH-RH,

indujo un nuevo aumento significativo en los niveles de LH y FSH en el suero.³⁶ Esto demostró que el LH-RH es capaz de aumentar todavía más, la liberación de LH tanto en el hombre como en la mujer con niveles basales elevados de gonadotropinas en el suero. Un aspecto interesante de este estudio, fue el hallazgo inesperado de una falta de respuesta al LH-RH y Clomifén en uno de los sujetos, un médico joven de 27 años, que entonces era becario del curso de graduados en endocrinología. Mayores estudios revelaron la presencia de un tumor de la pituitaria, el primero en ser diagnosticado mediante la administración de LH-RH.

En estos primeros tres estudios clínicos con LH-RH, utilizamos intencionalmente dosis elevadas de la hormona hipotalámica con el fin de aumentar las probabilidades de obtener una buena respuesta, calculando las dosis en base a estudios previos en animales y éstas variaron entre 0.7 a 1.5 mg de LH-RH purificado. A fin de cuantificar la dosis mínima efectiva en el humano y para establecer una curva de dosis respuesta, administramos en tres hombres normales siete dosis diferentes que oscilaron entre 0.001 a 0.8 mg. Encontramos que la menor dosis de LH-RH endovenoso, capaz de producir un aumento significativo de LH en el suero fue de 10 µg., pero para ocasionar un aumento significativo de FSH fue de 30 µg.³⁷ En la curva log-dosis-respuesta se observó una tendencia lineal altamente significativa. Los resultados obtenidos indicaron que el LH-RH ocasiona liberación de LH y FSH en el hombre en dosis mucho menores a las utilizadas previamente.

También pudimos estudiar LH-RH natural en niños, con el objeto de constatar diferencias entre la respuesta de los prepúberes y los adultos. Con este fin administramos 300 µg de LH-RH en cuatro sujetos humanos prepúberes y cuatro adultos. Los aumentos producidos en los niveles de LH y FSH en el plasma, fueron altamente significativos a los 16 y 32 minutos, pero no hubo diferencia alguna en cuanto a la edad y sexo.³⁸ El promedio máximo de aumento de LH fue de 290% para el hombre y 425% para la mujer, mientras que el aumento de los niveles de LH fue de 500% en los niños y 850% en las niñas. No se presentó elevación alguna en los niveles de hormona de crecimiento, tirotropina y cortisol. Se concluyó que el LH-RH es una potente y específica hormona hipotalámica liberadora de

LH y FSH, tanto en niños prepúberes, así como en adultos normales. Este estudio también indicó que la pituitaria no es el órgano limitante en la aparición de la pubertad.

Un importante uso clínico de LH-RH, sería el de diferenciar entre trastornos hipotalámicos y trastornos hipofisarios, relacionados con la secreción de gonadotropinas. Con el objeto de valorar este papel potencial del LH-RH, se investigó el efecto de LH-RH administrado conjuntamente con TRH, en tres pacientes con acromegalia producida por tumores hipofisarios.³⁹ Por demás interesante, fue el observar que los tres pacientes estudiados, presentaron diferentes tipos de respuestas a las dos hormonas. En el primer sujeto, la administración de LH-RH ocasionó un aumento en los niveles de LH pero la inyección de TRH no produjo aumento alguno en el TSH. En contraste, en el segundo paciente hubo un aumento de TSH como consecuencia de la administración de TRH pero no se observó elevación alguna de LH como respuesta a la administración de LH-RH. El tercer paciente, con acromegalia discreta, tuvo una respuesta positiva tanto al LH-RH como al TRH. Así, observamos tres diferentes patrones de respuesta hormonal producida después de la administración de LH-RH y TRH en tres pacientes con acromegalia, lo cual demuestra la variabilidad en esta enfermedad del trastorno hormonal. Este estudio también indica la utilidad potencial, así como las limitaciones de la prueba de LH-RH y TRH en el diagnóstico de los trastornos pituitarios.

También estudiamos otras condiciones patológicas como los síndromes de Klinefelter, Turner y Kallman, mediante la administración de LH-RH natural. Estos pacientes como era de esperarse, presentaban niveles elevados de gonadotropinas, tal y como se observa en la mujer posmenopáusica. La administración de LH-RH ocasionó un nuevo aumento en la liberación de LH y FSH. En los pacientes con síndrome de Kallman, los niveles de gonadotropinas eran bajos, sin embargo hubo una pequeña pero significativa respuesta al LH-RH.⁴⁰

Al revisar éstos y otros estudios,⁴⁰ señalamos que todos los sujetos con valores normales, bajos o altos, de LH y FSH en el suero, respondían a la administración de LH-RH. Así, tenemos que sujetos con valores basales normales de LH y FSH, vg.

hombres y mujeres normales, niños y niñas normales y algunos pacientes con tumores pituitarios, respondían al LH-RH. Sujetos con niveles bajos de LH y FSH, tales como se encuentran en hombres tratados previamente con etinil-estradiol, en mujeres pretratadas con lyndiol y en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico y anosmia, también fueron capaces de liberar LH y FSH en respuesta a la administración de LH-RH. Sujetos con niveles basales elevados de LH y FSH, incluyendo mujeres posmenopáusicas, hombres pretratados con clomifén, sujetos con síndrome de Turner y síndrome de Klinefelter, también respondieron al LH-RH.

Fuimos muy afortunados en poder disponer de una muy pequeña cantidad de LH-RH natural, purificado a partir de tejido hipotalámico humano y ser administrado en hombres normales. Debido a las pequeñas cantidades de LH-RH humano disponibles, las dosis administradas sólo aumentaron significativamente la liberación de LH.⁴¹ Sin embargo ésta ha sido la única vez que LH-RH natural humano, ha sido administrado en el hombre y demostrado que induce una respuesta.

También fuimos capaces de inducir ovulación en una mujer mediante la administración de LH-RH natural de origen porcino. LH-RH purificado se infundió por vía endovenosa durante 24 horas, en una mujer con amenorrea secundaria que había sido tratada previamente con gonadotropina menopáusica humana (Pergonal). LH-RH suplementario se inyectó rápidamente por vía endovenosa a las 8 y 24 horas durante la infusión. La ovulación indicada por elevación en la temperatura corporal y por un aumento acentuado en los niveles de pregnandiol urinario, fue confirmada por el embarazo.⁴² Esta fue la primera insinuación de que el LH-RH podría ser de utilidad en el tratamiento de algunos casos de infertilidad.

Los resultados de estos estudios tempranos con LH-RH natural, realizados en colaboración entre AVS y CG, fueron confirmados un año o dos después con LH-RH sintético.⁴³ Sin embargo estos primeros estudios clínicos con LH-RH natural, proporcionaron una base firme y una guía invaluable para todos los estudios posteriores efectuados con la forma sintética de la hormona.

Mientras tanto, debido a la ausencia de especificidad de especies y con las fuertes indicaciones de que el LH-RH podría ser clínicamente útil, si

podiera estar ampliamente disponible; impulsaron todavía más a AVS y sus colegas, a continuar con el vigoroso esfuerzo necesario para el aislamiento del LH-RH.

Es así como aún antes de que se terminaran algunos estudios clínicos con LH-RH natural, AVS y sus colegas en Nueva Orleans, establecieron la secuencia de los aminoácidos del LH-RH porcino y sintetizaron la hormona.⁶⁻⁹ El mismo AVS aisló una pequeña cantidad de LH-RH a partir de 160,000 hipotálamos⁷ y sus colegas químicos, Yoshihiko Baba e Hisayuki Matsuo, fueron capaces de establecer la secuencia de aminoácidos y efectuar la síntesis una vez que se percataron de que existían en el péptido 10 aminoácidos en lugar de nueve.^{6,44} Otro colega de Nueva Orleans, Akira Arimura, gracias a un excelente anticuerpo al LH donado por Gordon Niswender; fue capaz de demostrar que el decapeptido sintético, era altamente activo en la rata para liberar LH *in vivo*. El anuncio por AVS del aislamiento y estructura del LH-RH, fue un gran evento durante la LV Reunión Anual de la Sociedad de Endocrinología de los E.U.A. que tuvo lugar en San Francisco, California del 24 al 26 de junio de 1971.⁴⁵ En esta misma reunión CG presentó los efectos del LH-RH natural porcino en el hombre y su uso como una prueba diagnóstica.⁴⁶ Una vez más, nuestra colaboración tuvo éxito.

Nuevos estudios demostraron que tanto la hormona natural como el LH-RH sintético estimulaban la liberación tanto de FSH como de LH. AVS y sus colaboradores formularon el concepto de que una sola hormona hipotalámica designada LH-RH/FSH o simplemente GnRH, controlaba la secreción de ambas gonadotropinas en la glándula pituitaria.^{8,9} Sin embargo la abreviación GnRH para la hormona liberadora de gonadotropinas resultó ser muy confusa, por su similitud con la GH-RH (hormona liberadora de hormona de crecimiento), por lo que más tarde fue repetidamente recomendado que la abreviación LH-RH debería ser usada, cuando menos para sus análogos.^{1,2,47}

CG y AVS y sus varios colegas, prosiguieron para demostrar que la preparación sintética daba en el hombre los mismos resultados, bajo condiciones diferentes, como los había dado previamente la hormona natural.⁴³ Debido a que el LH-RH sintético estimulaba en el hombre la liberación de LH y FSH, se podía producir en grandes cantidades y que para

nuestra gran satisfacción no producía efectos colaterales, ahora era posible efectuar diversos estudios clínicos. En los primeros años de la década de 1970, CG resumió estos estudios iniciales, efectuados tanto con LH-RH como TRH.⁴⁸⁻⁵⁰ Sin la colaboración entre AVS y CG, este trabajo no se hubiera efectuado con la rapidez que se hizo.

En estos mismos primeros años de los setenta, CG se involucró en una nueva colaboración internacional entre el INN y la OMS, en aspectos relacionados con biología de la reproducción y entrenamiento en investigación y por lo tanto ya no le fue posible dedicar el tiempo necesario para continuar con nuestros estudios. Entonces él (CG) recomendó a AVS, que se continuara la colaboración con México entre AVS y Arturo Zárate. Zárate había sido un estudiante de postgrado con CG y en 1971, era el Jefe del Departamento de Ginecología Endocrina en un excelente hospital del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). AVS aceptó rápidamente esta proposición y además inició nuevas investigaciones con un colega de Zárate, el Dr. David González-Bárcena a quien AVS había conocido en 1970 en San Paulo, Brasil, durante el VII Congreso Panamericano de Endocrinología. Tanto Zárate como González-Bárcena continuaron trabajando con AVS realizando estudios clínicos con LH-RH porcino y sintético.^{39,42} Zárate y colaboradores fueron capaces de inducir ovulación en varias mujeres con amenorrea hipotalámica, de las cuales dos, se embarazaron.⁵¹ Este estudio demostró que el LH-RH sintético es capaz de liberar suficiente FSH y LH para inducir desarrollo folicular, así como ovulación y estableció su utilidad potencial en el tratamiento de algunos casos de esterilidad.

En la actualidad el LH-RH es considerado que tiene un particular valor diagnóstico en la investigación en hombres y mujeres con deterioro de la fertilidad. En el lado terapéutico, numerosos informes indican que la administración pulsátil de LH-RH, puede inducir ovulación en pacientes con anovulatorios. El LH-RH también se utiliza para lograr el descenso de los testículos en niños con criptorquidea. Además, la terapéutica con LH-RH puede ser de utilidad para normalizar la función testicular en pacientes con hipogonadismo hipotalámico idiopático, en los cuales existe un deterioro de la liberación de LH-RH endógeno.⁵² Sobre todo,

la colaboración de AVS y sus colegas Mexicanos, no sólo fue productiva al demostrar la relevancia del LH-RH en fisiología humana, sino que también fue clave para la introducción del LH-RH en el campo de la terapéutica.

Análogos de LH-RH

En los años que siguieron al aislamiento de LH-RH, AVS y su grupo, se constituyeron en uno de los varios laboratorios que sintetizaron una amplia gama de péptidos análogos de LH-RH.^{1,2} Eventualmente se hizo patente que existían dos claras categorías de estos análogos:

1. Análogos estimulatorios superactivos que ocasionan una liberación prolongada de LH y FSH. Más tarde se encontró que la administración repetida de estos análogos, causa una retrorregulación de los receptores pituitarios de LH-RH, lo cual conduce a inhibición, en lugar de estimulación, de la secreción de gonadotropinas y de esteroides sexuales. Esto constituye la base de sus aplicaciones en ginecología y oncología.^{1,2}
2. Análogos antagonistas que bloquean los receptores de LH-RH y producen una inhibición inmediata de la liberación de LH y FSH y de la secreción de esteroides sexuales.^{1,2}

Un extenso trabajo desarrollado en las últimas dos décadas, ha demostrado que los agonistas de LH-RH pueden ser utilizados en el tratamiento de neoplasias hormono-dependientes y en problemas ginecológicos, tales como endometriosis y leiomiomas, así como en procedimientos de reproducción asistida IVT-ET.^{1,2} Los agonistas de LH-RH, también han sido ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer prostático avanzado^{1,2} y en algunos casos de cánceres mamarios premenopáusicos.²

AVS continuó su colaboración con sus colegas Mexicanos. en una parte de este proyecto. Por ejemplo, en colaboración con David González-Bárcena demostró por primera vez en 1977, que uno de los primeros antagonistas de LH-RH (D-Phe²,D-Trp³,D-Phe⁴-LH-RH) suprime significativamente en hombres normales la liberación de LH y

FSH como respuesta al LH-RH.⁵⁴ Más tarde con Zárate y Elías Canales, demostraron que los agonistas de LH-RH son capaces de inhibir el aumento rápido de LH y FSH y por lo tanto la ovulación, a mediados del ciclo de mujeres con ciclos normales.⁵⁵ Sin embargo la disponibilidad de análogos de LH-RH para su uso como anticonceptivo, todavía es cuestionable.

Se espera que la utilización de antagonistas de LH-RH, sea similar a la de los agonistas.^{1,2,53} En estudios más recientes en colaboración con David González-Bárcena en el Hospital de la Raza del IMSS, demostramos que en el cáncer prostático y en otras indicaciones como en Leiomiomas, los nuevos antagonista de LH-RH como el Cetrorelix, podrían tener una ventaja sobre los agonistas, basada en el hecho de que éstos inhiben LH, FSH y la secreción de esteroides sexuales, inmediatamente después de iniciar su uso y por lo tanto en comparación con los agonistas, reduce el tiempo de iniciación de sus efectos terapéuticos.^{56,57} La rápida reducción del tamaño de la próstata y de la mejoría de los síntomas urinarios que se obtienen en hombres con hiperplasia prostática benigna, sugiere que los antagonistas de LH-RH ofrecen una alternativa terapéutica en pacientes que se consideran como un mal riesgo quirúrgico.^{56,58} En consecuencia, la dirección de los estudios de colaboración en México, han cambiado claramente de la endocrinología y ginecología, a la oncología.⁵⁹⁻⁶¹

Epílogo y reflexiones

El papel clave que CG desempeñó en las primeras pruebas clínicas con TRH y LH-RH, fue reconocido por clínicos de los Estados Unidos de América y así, fue invitado a presentar su trabajo en las Conferencias Laurentianas de Hormonas en 1971.²⁴ Estas realizaciones también fueron reconocidas en una sesión en 1971 por la Academia Nacional de Medicina de México. Gracias al eficiente liderazgo de CG, estos estudios clínicos contribuyeron para ubicar a México como un centro destacado de neuroendocrinología y endocrinología. CG al proseguir su carrera en la medicina Mexicana, fue nombrado Presidente de la Academia Mexicana de Ciencias,(1975) de la Academia

Nacional de Medicina (1983) y Subsecretario de Asistencia de la Secretaría de Salubridad y Asistencia (1976-1980).

AVS por su parte fue reconocido por sus contribuciones a la ciencia y medicina Mexicanas y fue electo en 1971 como Miembro Honorario de la Academia Nacional de Medicina, seis años antes de que un honor semejante, le hicieran por sus logros en investigación básica; en la Academia Nacional de Ciencias de los E.U.A. Después de recibir en 1974 los muy prestigiados Premios Gairdner y Charles Mickle de Canadá y un año después los Premios Lasker y Borden de los E.U.A.; AVS fue altamente honrado para compartir en 1977 el Premio Nóbel de Fisiología o Medicina "por sus descubrimientos relacionados con la producción de hormonas peptídicas en el cerebro" (la cita original del premio en Sueco, dice "för deras upptäckter rörande hjärnans produktion av peptidhormoner."). Para connotar la importancia de la colaboración de AVS y CG en el trabajo sobre TRH y LH-RH, AVS se complació en invitar a CG (así como a Abba Kastin y David González Bárcena, el primero de ellos por haber instrumentado con gran efectividad la colaboración con Zárate y González Bárcena), a participar y compartir el honor en las Ceremonias del Premio Nóbel, que tuvieron lugar en Estocolmo, Suecia, en diciembre de 1977.

La colaboración de AVS fue también reconocida en agosto de 1978 por el Gobierno de México, siendo recibido en audiencia privada, para felicitarlo personalmente, por el Lic. José López-Portillo, Presidente de la República y además por la Academia Nacional de Medicina quien le entregó en esa misma fecha, un Diploma y Medalla de reconocimiento. En noviembre de 1997 el Director General del IMSS, le concedió un Premio por sus contribuciones al desarrollo de la Endocrinología Mexicana. Tal y como se mencionó con anterioridad, AVS ha reorientado su interés a partir de 1976, al campo del cáncer.

En el transcurso de esta colaboración se estableció una gran amistad entre CG y AVS, así como entre nuestras esposas Beatriz B. Gual y Ana María Comaru-Schally, amistad que también se hizo extensiva a otros colaboradores y amigos cercanos de CG, quienes nos brindaron su apoyo y consejo; como fue el caso del Dr. Jorge Martínez-Manautou, Director de los Programas de Planificación Familiar de México de 1977 a 1982. La

colaboración científica entre CG y AVS se facilitó por el conocimiento de Inglés por parte de CG, así como por su familiaridad con los procedimientos médicos y científicos de los E.U.A. En forma semejante, esta amistad se facilitó para AVS por el conocimiento y respeto de la historia, costumbre y tradiciones de México y por su familiaridad con el idioma español. En sus más de 80 visitas a México siempre fue tratado por todos, con grandes muestras de amistad y cortesía.

Después de haber transcurrido más de 30 años de nuestros primeros estudios y debido a nuestro inagotable interés por la investigación médica, hemos planeado nuevas investigaciones clínicas utilizando diversos análogos peptídicos antitumorales de reciente creación.^{2-4,59} Estas investigaciones que serán coordinadas en México por CG, seguramente renovarán nuestra antigua y estrecha colaboración.

Sinopsis

Se revisaron los primeros estudios clínicos efectuados en México con TRH y LH-RH naturales y sintéticos y se consideran en retrospectiva los antecedentes de la carrera competitiva sostenida por AVS y su grupo, en el aislamiento y elucidación estructural del TRH y LH-RH y se reexaminan y analizan las prioridades sobre los hallazgos clínicos con el uso de estas dos hormonas liberadoras hipotalámicas. Este artículo se presenta como un relato de una exitosa colaboración internacional de investigación médica, entre E.U.A y México.

Referencias

1. **Schally AV.** Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: Their impact on the control of tumorigenesis. *Peptides* 1999;20:1247-1262.
2. **Schally AV, Comaru-Schally AM.** Hypothalamic and other peptide hormones. In: *Cancer Medicine*, 5th Edition, edited by Bast RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei III E. PP. 715-729 Lewiston NY, B.C. Decker Inc., 2000.
3. **Schally AV, Nagy A.** Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur J Endocrinol* 1999;141:1-14.
4. **Nagy A, Schally AV, Armatís P, Szepeshazi K, Halmos G, Kovacs M, Zarandi M, Groot K, Miyazaki M, Jungwirth A, Horvath J.** Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-

- releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7269-7273.
5. **Chatzistamou I, Schally AV, Nagy A, Armatís P, Szepeshazi K, Halmos G.** Effective treatment of metastatic MDA-MD-435 human estrogen independent breast carcinomas with a targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone, AN-207. *Clinical Cancer Research* 2000;6:41584165.
6. **Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Arimura A, Schally AV.** Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1971;43:1334-1339.
7. **Schally AV, Arimura A, Baba Y, Nair RMG, Matsuo H, Redding TW, Debeljuk L, White WF.** Isolation and properties of the FSH- and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1971;43:393-399.
8. **Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RMG, Debeljuk L, White WF.** Gonadotropin-releasing hormone: One polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 1971;173:1036-1038.
9. **Schally AV, Kastin AJ, Arimura A.** Hypothalamic FSH and LH-regulating hormone, structure, physiology, and clinical studies. *Fertil Steril* 1971;22:703-721.
10. **Saffran M, Schally AV.** The status of the corticotropin releasing factor (CRF). *Neuroendocrinology* 1977;24:359-375.
11. **Greep RO.** Synthesis and Summary, Chapter 15. In *Advances in Neuroendocrinology*, edited by AV Nalbandov, PP. 511-517. Urbana, IL. University of Illinois Press, 1963.
12. **Schally AV, Arimura A, Bowers CY, Kastin AJ, Sawano S, Redding TW.** Hypothalamic neurohormones regulating anterior pituitary function. In: *Recent Progress in Hormone Research Vol. 24*, edited by. Astwood EB, pp.497-587, New York, Academic Press, 1968.
13. **Schally AV, Bowers CY, Redding TW, Barrett JF.** Isolation of Thyrotropin Releasing Factor (TRF) From Porcine Hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 1966;25:165-169.
14. **Folkers K, Enzmann F, Bøler J, Bowers CY, Schally AV.** Discovery of Modification of the Synthetic Tripeptide-Sequence of the Thyrotropin Releasing Hormone Having Activity. *Biochem Biophys Res Commun*, submitted August 8 1969, published September 24, 1969;37:123-126.
15. **Bler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY, Schally AV.** The Identity of Chemical and Hormonal Properties of the Thyrotropin Releasing Hormone and Pyroglutamyl-Histidine-Proline Amide. *Biochem Biophys Res Comm*, submitted September 22, 1969, published November 6, 1969;37:705-710.
16. **Nair RMG, Barreiff JF, Bowers CY, Schally AV.** Structure of Porcine Thyrotropin Releasing Hormone. *Biochemistry* 1970;9:1103-1106.
17. **Bowers CY, Schally AV, Enzmann, Bøler J, Folkers K.** Porcine Thyrotropin Releasing Hormone is (Pyro) Glu-His-Pro(NH₂). *Endocrinology* 1970;86:1143-1153.
18. **Schally AV, Redding TW, Bowers CY, Barrett JF.** Isolation and properties of porcine thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem* 1969;244:4077-4088.

19. **Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, Guillemin R.** Structure moleculaire du facteur hypothalamique hypophysiotrope TRF d'origine ovine: mise en evidence par spectrometrie de masse de la sequence PCA His-Pro-NH₂. C.R. Acad. Sci. Paris 1969;269:1870-1873.
20. **Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, Ward DN, Vale W, Guillemin R.** Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor. *Nature, Lond.* 1970;226:321-325.
21. **Bowers CY, Schally AV, Hawley WD, Gual C, Parlow A.** Effect of thyrotropin-releasing factor in man. *J Clin Endocr Metab* 1968, received Nov 27, 1967. Published July 1968;28:978-982.
22. **Bowers CY, Schally AV, Schalch DS, Gual C, Kastin AJ, Folkers K.** Activity and specificity of synthetic thyrotropin-releasing hormone in man. *Biochem Biophys Res Commun* received March 9, published May 11, 1970;39:352-355.
23. **Bowers CY, Schally AV, Kastin AJ, Arimura A, Schalch DS, Gual C, Castañeda E, Folkers K.** Synthetic thyrotropin releasing hormone (TRH)-Activity in men and women. Specificity of action, inhibition by triiodothyronine and activity orally. *J Med Chem*, received December 29, 1970 published June 1971;14:477-481.
24. **Gual C, Kastin AJ, Schally AV.** Clinical Experience with Hypothalamic Releasing Hormones Part 1. Thyrotropin-Releasing Hormone. In: *Proceedings of 1971 Laurentian Hormone Conference; Recent Progress in Hormone Research*, edited. by EB Astwood 28:173-200, Academic Press, 1972.
25. **Anderson MS, Bowers CY, Kastin A, Schalch DS, Schally AV, Snyder PJ, Utiger RD, Wilber JF, Wise AJ.** Synthetic Thyrotropin Releasing Hormone (TRH): A Potent Stimulator of Thyrotropin Secretion in Man. *N Engl J Med* 1971;285:1279-1238.
26. **Hall R, Amos J, Garry R, Buxton RL.** Thyroid-stimulating hormone response to synthetic thyrotropin releasing hormone in man. *Br Med J* 1970;2:274-277.
27. **Fleischer N, Burgus R, Vale W, Dunn T, Guillemin R.** Preliminary observations on the effect of synthetic thyrotropin releasing factor on plasma thyrotropin levels in man. *J Clin Endocrinol Metab* July 1970;31:109-112.
28. **Hershman J, Pittman, Jr. J.** Response to synthetic thyrotropin-releasing hormone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1970;31:457-460.
29. **Ormston BJ, Garry R, Cryer RJ, Besser GM, Hall R.** Thyrotropin-releasing hormone as a thyroid function test. *Lancet* 1971;2:10-14.
30. **Jacobs LS, Snyder PJ, Wilber JF, Utiger RD, Daughaday WH.** Increased serum prolactin after administration of synthetic thyrotropin releasing hormone (TRH) in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;33:996-998.
31. **Bowers CY, Friesen HC, Hwang P, Guyda HT, Folkers K.** Prolactin and thyrotropin release in man by synthetic pyroglutamyl-histidyl-prolinamide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1971;45:1033-1041.
32. **Kastin AJ, Schally AV, Gual C, Midgley AR Jr, Bowers CY, Díaz-Infante Jr. A.** Stimulation of LH release in men and women by LH-releasing hormone purified from porcine hypothalamic. *J Clin Endocrinol Metab* 1969;29:1046-1050.
33. **Igarashi A, Yokoto N, Ehara Y, Mayuzumi R, Hirano T, Matsumoto S, Yamasaki M.** Clinical effects with partially purified beef hypothalamic FSH-Releasing factor. *Am J Obstet Gynecol* 1968;100:867-870.
34. **Root AW, Smith GP, Dhariwal APS, McCann SM.** Luteinizing hormone releasing activity of crude ovine hypothalamic extract in man. *Nature (Lond)* 1969; 221:570-572.
35. **Kastin AJ, Schally AV, Gual C, Midgley AR Jr., Bowers CY, Gómez-Pérez F.** Administration of LH-Releasing Hormone to Selected Human Subjects. *Am J Obstet Gynecol* 1970;108:177-182.
36. **Kastin AJ, Schally AV, Gual C, Midgley AR Jr, Miller MC III, Flores F.** Increased Release of LH After Administration of LH-RH to Men Pretreated with Clomiphene. *J Clin Endocrinol Metab* 1970;31:689-692.
37. **Kastin AJ, Schally AV, Gual C, Midgley AR Jr, Miller MC III, Cabeza A.** Dose-Response Relationship of LH to LH-Releasing Hormone in Man. *J Clin Invest* 1971;50: 1551-1553.
38. **Kastin AJ, Schally AV, Schalch DS, Korenman SG, Miller MC III, Gual C, Pérez-Pasten E.** Characterization of Hormonal Responses to Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) in Prepubertal and Adult Subjects. *Pediatr Res* 1972;6:481-486.
39. **Kastin AJ, Schally AV, González-Bárcena D, Schalch DS, Lee L.** Different Responses to Two Hypothalamic Hormones in Acromegalics. *Arch Intern Med* 1972;130: 923-927.
40. **Kastin AJ, Gual C, Schally AV.** Clinical Experience with Hypothalamic Releasing Hormones. Section II: Luteinizing Hormone-Releasing Hormone and Other Hypophysiotropic Releasing Hormones. In: *Proceedings of 1971 Laurentian Hormone Conference; Recent Progress in Hormone Research* edited by EB Astwood 28:201-227, Academic Press, 1972.
41. **Kastin AJ, Schally AV, Gual C, Midgley AR Jr, Arimura A, Miller MC III, Cabeza A.** Administration of LH Releasing Hormone of Human Origin to Man. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;32:287-289.
42. **Kastin AJ, Zárate A, Midgley AR Jr, Canales ES, Schally AV.** Ovulation Confirmed by Pregnancy After Infusion of Porcine LH-RH. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;33:980-982.
43. **Kastin AJ, Schally AV, Gual C, Arimura A.** Release of LH and FSH After Administration of Synthetic LH-Releasing Hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1972;34:753-756.
44. **Arimura A.** The backstage story of the discovery of LHRH. *Endocrinology* 1991;129:1687-1689.
45. **Schally AV, Arimura A, Baba Y, Nair RMG, Matsuo H, Redding TW, Debeljuk L, White WF.** Purification and properties of the LH and FSH-releasing hormone from porcine hypothalamus. Abstract 53rd meeting Endocrine Society, San Francisco, California June 24-26, 1971. Abstract No.55, p. A-70.
46. **Gual C, Kastin AJ, Midgley AR Jr., Flores F.** Administration of LH-releasing hormone (LH-RH) as a clinical test of pituitary function. Abstract 53rd meeting Endocrine Society, San Francisco, California June 24-26, 1971. Abstract No.171, p. A-128.

47. **Schally AV.** Use of GnRH in preference to LH-RH terminology in scientific papers. *Human Reproduction* 2000;15:2059-2061.
48. **Gual C.** Efectos clínicos y usos de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas. *Anales de Endocrinología y Nutrición Madrid* 1972;1:251-276.
49. **Gual C.** Clinical effects and uses of hypothalamic releasing factors. In: *Frontiers in Neuroendocrinology*, 1973, edited by. W F Ganong and L Martini p.89-131 Oxford University Press, 1973.
50. **Gual C.** Induction of ovulation with various regimens of Luteinizing hormone-releasing hormone administration. In: *Physiology and Genetics of Reproduction, Part A*, edited by: E.M. Coutinho and F. Fuchs p.355-370, New York, Plenum Publishing Co. 1974.
51. **Zarate, A., Canales, ES., Schally, A.V., Ayala-Valdes, L. and Kastin, A.J.** Successful Induction of Ovulation with Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in Anovulatory Infertility. *Fertil Steril* 1972;23:672-674.
52. **Mortimer CH, McNeilly AS, Fisher RA, Murray MAF, Besser GM.** Gonadotropin releasing hormone therapy in hypogonadal males with hypothalamic or pituitary dysfunction. *Br Med. J* 1974;4:617-621.
53. **Schally AV.** LH-RH Analogues I: Their impact on reproductive medicine. *Gynecological Endocrinology (Special Millennium Issue)*, December 1999;13:401-409.
54. **González-Bárcena D, Kastin AJ, Coy DH, Nikolics K, Schally AV.** Suppression of Gonadotropin Release in Man by an Inhibitory Analogue of LH-Releasing Hormone. *Lancet* 1977;ii:997-998.
55. **Zárate A, Canales ES, Sthory I, Coy DH, Comaru-Schally AM, Schally AV.** Anovulatory effect of an LH-RH antagonist in women. *Contraception* 1981;24:315-320.
56. **González-Bárcena D, Vadillo-Buenfil M, Gómez-Orta F, Fuentes-García M, Cárdenas-Carnejo I, Graef-Sánchez A, Comaru-Schally AM, Schally AV.** Responses to the Antagonistic Analog of LH-RH (SB-75, Cetrorelix) in Patients with Benign Prostatic Hyperplasia and Prostatic Cancer. *The Prostate* 1994; 24:84-92.
57. **González-Bárcena D, Vadillo-Buenfil M, Cortáz-Morales A, Fuentes-García M, Cárdenas-Cornejo I, Comaru-Schally AM, Schally AV.** Luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75 (Cetrorelix) as primary single therapy in patients with advanced prostatic cancer and paraplegia due to metastatic invasion of spinal cord. *Urology* 1995;45:275-281.
58. **Comaru-Schally AM, Brannan W, Schally AV, Colcolough M, Monga M.** Efficacy and safety of luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix in the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3826-3831.
59. **Schally AV, Comaru-Schally AM, Plonowski A, Nagy A, Halmos G, Rekasi Z.** Peptide analogs in the Therapy of Prostate Cancer. *The Prostate* 2000;45:158-166.
60. **Schally AV.** Hypothalamic Hormones: From Neuroendocrinology to Cancer Therapy Anti-Cancer Drugs 1994; 5:115-130.
61. **Schally AV, Comaru-Schally AM, Nagy A, Kovacs M, Szepeshazi K, Plonowski A, Varga J, Halmos G.** Hypothalamic Hormones and Cancer. *Frontiers in Neuroendocrinology, Invited Review*, 2001;22: 1-44.