

Η επίδραση των SERMs στην έκκριση των γοναδοτροπινών ορμονών

Αντώνης Γκαράς, Αθανάσιος Καλλιτσάκης, Ιωάννης Ε. Μεσσίνης

Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Λάρισα

Αλληλογραφία: Γκαράς Αντώνης, Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, 41110, Λάρισα.
Τηλ.: 2410-682795, E-mail:garasant@yahoo.gr

Περίληψη

Τα οιστρογόνα είναι οι κύριοι ρυθμιστές της έκκρισης των γοναδοτροπινών. Η ανακάλυψη και δεύτερου οιστρογονικού (ER-β) υποδοχέα επέπλεξε περαιτέρω την κατανόηση του μηχανισμού δράσης του συμπλέγματος οιστρογόνου-οιστρογονικού υποδοχέα και κατά συνέπεια την κατανόηση του μηχανισμού που ρυθμίζει την έκκριση των γοναδοτροπινών. Τελευταία, υπήρξαν μελέτες που έκαναν λόγο και για δράση των οιστρογόνων μέσω υποδοχέων εκτός του κυτταρικού πυρήνα (non-genomic).

Οι SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators) ασκούν τη δράση τους στους οιστρογονικούς υποδοχείς, αλλά σε ό,τι αφορά στην έκκριση των γοναδοτροπινών η δράση τους διαφέρει. Η κλομφαίνη, που έχει μελετηθεί εκτεταμένα, φαίνεται να ασκεί αντιοιστρογονική δράση στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας και οιστρογονική δράση στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Παρόμοια δράση, στον υποθάλαμο, φαίνεται να έχει και η ταμοξιφαίνη. Σε ό,τι αφορά στη δράση της ραλοξιφαίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών, αν και τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι λίγα, φαίνεται να είναι αντιοιστρογονική αλλά ισχυρότερη από αυτήν της κλομφαίνης, στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας, αν και για την επιβεβαίωση αυτού απαιτούνται δόσο-ισοδύναμες μελέτες. Στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η χορήγηση ραλοξιφαίνης φαίνεται να μην επηρεάζει τα επίπεδα των γοναδοτροπινών ή να ασκεί μία ήπια οιστρογονική δράση. Επίσης, θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν και νεότερα δεδομένα, τα οποία κάνουν λόγο για δράση των SERMs, στην έκκριση των γοναδοτροπινών μέσω μηχανισμών στους οποίους δεν συμμετέχουν οι οιστρογονικοί υποδοχείς (non-genomic).

Λέξεις κλειδιά: οιστρογονικοί υποδοχείς, ραλοξιφαίνη, κλομφαίνη, γοναδοτροπίνες, SERMs

Εισαγωγή

SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) ονομάζεται η ουσία που μπορεί να δρα ως οιστρογονικός αγωνιστής ή ανταγωνιστής, ανάλογα με τον συγκεκριμένο ιστό-στόχο. Για παράδειγμα, η δράση

της ταμοξιφαίνης στο μαζικό αδένος είναι αντιοιστρογονική, ενώ αντίθετα στο ενδομήτριο είναι οιστρογονική. Η κλομφαίνη, που αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ουσία στη θεραπεία της

ανωθυλακιορρηκτικής υπογονιμότητας, ασκεί στην υπόφυση των γυναικών της αναπαραγωγικής ηλικίας αντιοιστρογονική δράση, ενώ στην υπόφυση των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, με τα τυπικά χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων, η δράση της είναι οιστρογονική. Η δράση τους αυτή πιστεύεται πως ασκείται μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων αν και νεότερα δεδομένα πιθανολογούν πως οι ουσίες αυτές μπορεί να δρουν και μέσω μηχανισμών στους οποίους δεν υπεισέρχονται οι οιστρογονικοί υποδοχείς.

Σκοπός αυτού του άρθρου είναι να συνθέσει και να παρουσιάσει τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν στην επίδραση των ουσιών αυτών και κυρίως της ραλοξιφαίνης και της κλομιφαίνης, στην έκκριση των γοναδοτροπινών ορμονών, στοχεύοντας στο να δώσει συνοπτικά τις δράσεις των ουσιών αυτών στο υποθαλαμο-υπόφυσιικό σύστημα αξιοποιώντας τα νεότερα δεδομένα.

1. Οιστρογόνα και οιστρογονικοί υποδοχείς

Τα οιστρογόνα αποτελούν μία από τις σημαντικότερες ορμόνες του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας τα οιστρογόνα είναι οι κύριοι ρυθμιστές της έκκρισης των γοναδοτροπινών. Στις γυναίκες που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση τα επίπεδα των ενδογενών οιστρογόνων είναι σημαντικά μειωμένα σε σχέση με αυτά της αναπαραγωγικής περιόδου και κατά συνέπεια και ο ρόλος τους είναι περιορισμένος. Ωστόσο, όταν χορηγούνται εξωγενώς, μπορούν να τροποποιήσουν τα επίπεδα των γοναδοτροπινών στο αίμα.

Οι δράσεις των οιστρογόνων ασκούνται μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων. Σήμερα είναι γνωστοί δύο οιστρογονικοί υποδοχείς, που ονομάζονται, ανάλογα και με τη σειρά με την οποία ανακαλύφθηκαν, -α και -β (ER-α και ER-β) και υπάγονται και οι δύο στους πυρηνικούς υποδοχείς. Τα οιστρογόνα αφού διαχυθούν διά μέσου των κυτταρικών μεμβρανών συνδέονται με τους πυρηνικούς αυτούς υποδοχείς, οι οποίοι, όπως υποδηλώνει και το όνομα, βρίσκονται μέσα στον κυτταρικό πυρήνα. Το σύμπλεγμα οιστρογόνου-υποδοχέα συνδέεται στη συνέχεια με συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA που ονομάζονται στοιχεία της οιστρογονικής δράσης (estrogen-response elements) και των οποίων η αλληλεπίδραση με άλλα κυτταρικά στοιχεία οδηγεί σε συγκεκριμένη ορμονική δράση, όπως γονιδιακή έκφραση, πρωτεϊνοσύνθεση κ.ά.

Επειδή οι δύο οιστρογονικοί υποδοχείς είναι πιθανό

να έχουν διαφορετική βιολογική δράση και επειδή ο υποδοχέας -α και ο υποδοχέας -β σχηματίζουν μεταξύ τους ετεροδιμερή επηρεάζοντας ο ένας τη δράση του άλλου (Pettersson et al., 1997), είναι σημαντικό να προσδιορίζεται η έκφραση των δύο υποδοχέων σε συγκεκριμένους ιστούς-στόχους.

Στον εγκέφαλο και πιο συγκεκριμένα στην υπόφυση, οι οιστρογονικοί υποδοχείς -α εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα γαλακτοτρόπα κύτταρα, σε χαμηλότερα επίπεδα στα γοναδοτρόπα κύτταρα και σε πιο χαμηλά επίπεδα στα άλλα είδη των κυττάρων (Shupnik et al., 2002). Στον άνθρωπο ο οιστρογονικός υποδοχέας -α δεν εκφράζεται καθόλου στα κύτταρα που παράγουν την αυξητική ορμόνη, ενώ στα κύτταρα που παράγουν την ACTH και την TSH δεν εκφράζεται πάντα. Στους αρουραίους, η έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα -α είναι πιο διάχυτα υπαρκτή (Friend et al., 1994; Mitchner et al., 1998).

Σε ό,τι αφορά στον οιστρογονικό υποδοχέα -β στην ανθρώπινη υπόφυση, εκφράζεται στα σωματοτρόπα και στα κορτικοτρόπα κύτταρα. Ο οιστρογονικός υποδοχέας -β είναι ο μόνος που εκφράζεται σε αυτά τα δύο είδη των κυττάρων της υπόφυσης και αυτό ίσως να εξηγεί μερικές άμεσες δράσεις των οιστρογόνων στην έκκριση της ACTH και της GH (Chaidarum et al., 1998; Shupnik et al., 1998).

Οι Shughrue et al. (1997) μελέτησαν την παρουσία του mRNA των οιστρογονικών υποδοχέων -α και -β στο κεντρικό νευρικό σύστημα των αρουραίων. Κατέληξαν στο συμπέρασμα πως οι νευρώνες του οσφρητικού βολβού, του υπεροπτικού πυρήνα, του παρακοιλιακού πυρήνα, του υπερχιασματικού πυρήνα, της παρεγκεφαλίδας και του κωναρίου περιέχουν αποκλειστικά mRNA του οιστρογονικού υποδοχέα -β. Αντίστοιχα, υπάρχουν περιοχές οι οποίες περιέχουν αποκλειστικά mRNA του οιστρογονικού υποδοχέα -α, ενώ άλλες περιοχές του εγκέφαλου, όπως είναι η προοπτική και ο παραβραχιακός πυρήνας, περιέχουν mRNA και των δύο υποδοχέων.

Ωστόσο, πέρα από την κλασική οδό δράσης των οιστρογόνων μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων, τα τελευταία χρόνια δημοσιεύονται όλο και περισσότερες μελέτες, οι οποίες υποστηρίζουν έναν άλλο μηχανισμό δράσης των οιστρογόνων, στον οποίο δε συμμετέχουν οι οιστρογονικοί υποδοχείς -α και -β, του κυτταρικού πυρήνα. Οι Tesarik et al. (1995) κατέδειξαν πως η 17-β οιστραδιόλη ασκεί μία άμεση δράση στο ωριμάζον ανθρώπινο ωοκύτταρο, προκαλώντας παροδικές αυξήσεις στη συγκέντρωση του ενδοκυττάρου ελεύθερου Ca, με μηχανισμό στον οποίο δεν συμμετέχουν οι οιστρογονικοί υπο-

δοχείς. Επιπλέον, οι Milner et al. (2001) με μελέτες υπερδομής κατέδειξαν πως στον εγκέφαλο των αρουραίων και συγκεκριμένα στην περιοχή του ιπποκάμπου υπάρχουν οιστρογονικοί υποδοχείς -α, οι οποίοι βρίσκονται εκτός του κυτταρικού πυρήνα. Επίσης, οι Cambiasso et al. (2001) καλλιέργησαν υποθαλαμικούς νευρώνες από άρρηνες αρουραίους με ή χωρίς την παρουσία 17-β οιστραδιόλης και διαπίστωσαν πως η αξιόγνος (axogenic) δράση της οιστραδιόλης ασκούνταν μέσω ενός μηχανισμού, στον οποίο λάμβανε μέρος η κυτταρική μεμβράνη και όχι μέσω του κλασικού μηχανισμού, στον οποίο συμμετέχουν οι πυρηνικοί υποδοχείς.

2. SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators)

Μέχρι σήμερα τέσσερις SERMs έχουν πάρει έγκριση για κλινική χρήση. Οι τρεις από αυτούς αποτελούν ουσίες που ανήκουν στην οικογένεια του τριφαινόλαιθυλενίου και είναι η κλομφαίνη, η ταμοξιφαίνη και η τορεμιφαίνη. Η ραλοξιφαίνη, ο άλλος SERM που βρίσκεται σε κλινική χρήση, ανήκει στην οικογένεια των βενζοθειοφαινών.

Η μεγάλη έρευνα για τις ουσίες αυτές άρχισε στη δεκαετία του 1960 σε πειραματόζωα, όταν βρέθηκε πως οι ουσίες αυτές, που θα μπορούσαν να έχουν κάποια οιστρογονική δραστηριότητα, ασκούσαν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των καρκινικών όγκων του μαστού.

Μερικοί από τους παράγοντες αυτούς δρουν ως ανταγωνιστές στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, όπως είναι ο μαστός ή το ενδομήτριο (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998; Baker et al., 1998) αλλά ασκούν αγωνιστική δράση στο σκελετό και στο λιποπρωτεϊνικό προφίλ (McDonald et al., 1995; Meunier et al., 1999). Μπορεί έτσι οι ουσίες αυτές να αποτελέσουν εναλλακτικές θεραπείες στην πρόληψη της οστεοπόρωσης. Ήδη, η ένδειξη της ραλοξιφαίνης είναι η πρόληψη ή η θεραπεία της οστεοπόρωσης. Ιδιαίτερα στις γυναίκες που παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού ή του ενδομητρίου ή στις γυναίκες, στις οποίες αντενδείκνυται η χορήγηση οιστρογόνων καθώς και σε αυτές που δεν επιθυμούν να πάρουν θεραπεία υποκατάστασης λόγω του φόβου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού ή του ενδομητρίου, δίνεται η δυνατότητα εναλλακτικών θεραπειών που δεν έχουν τις αντενδείξεις των οιστρογόνων.

Κάθε ένας από αυτούς τους παράγοντες, όπως όλες οι φαρμακευτικές ουσίες, αν και περιλαμβάνεται

στους SERMs, έχει το δικό του μοναδικό φάσμα δραστηριότητας με ποιοτικές και ποσοτικές διαφοροποιήσεις στις αγωνιστικές και ανταγωνιστικές ιδιότητές του στους διαφορετικούς ιστούς-στόχους.

Η κλομφαίνη χρησιμοποιείται στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας μόνο και λόγω της δράσης στην υπόφυση αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ουσία στη θεραπεία της ανωθυλακιορρηκτικής υπογονιμότητας. Η ταμοξιφαίνη και η τορεμιφαίνη που χορηγούνται τόσο στις μετεμμηνοπαυσιακές όσο και στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας με καρκίνο του μαστού, έχει βρεθεί, επίσης, πως επηρεάζουν τα επίπεδα των γοναδοτροπινών (The Surgical Clinics of North America, "Breast Cancer Management", 1999). Τέλος, χορήγηση της ραλοξιφαίνης που περιορίζεται, προς το παρόν, μόνο στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες για την πρόληψη ή τη θεραπεία της οστεοπόρωσης, φαίνεται να επιδρά στην υπόφυση και να επηρεάζει την έκκριση των γοναδοτροπινών (Baker et al., 1998).

Πιο αναλυτικά η δράση των κλομφαίνης, ταμοξιφαίνης και ραλοξιφαίνης στο υποθαλαμο-υποφυσιακό σύστημα είναι η εξής:

α) Η δράση της κλομφαίνης

Πριν γίνει αναφορά στην κλομφαίνη, ίσως θα ήταν ενδιαφέρον να αναφερθούν και μερικά στοιχεία χημείας και ονοματολογίας για το φαρμακευτικό αυτόν παράγοντα, γιατί σε μερικές εργασίες γίνεται λόγος μόνο για την μία ή για την άλλη μορφή, όπως εκτίθεται παρακάτω. Η κλομφαίνη υπάρχει σε δύο μορφές, την cis και την trans, ανάλογα με τις γεωμετρικές σχέσεις των δύο φαινυλικών δακτυλίων. Η cis μορφή ονομάζεται ζουκλομφαίνη και η trans μορφή ονομάζεται ευκλομφαίνη. Το ρακεμικό μείγμα που χρησιμοποιείται στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας για την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας αποτελείται κατά 38% από ζουκλομφαίνη και κατά 62% από ευκλομφαίνη.

Η κλομφαίνη άρχισε να χρησιμοποιείται στην πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας στη δεκαετία του 60. Για περισσότερο από 40 έτη παραμένει το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο φάρμακο στην πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας στις υπογόνιμες γυναίκες (Messinis and Milingos, 1997). Η χρήση της περιορίζεται στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας, αν και έχει χρησιμοποιηθεί και σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες στα πλαίσια διαφόρων μελετών (Kauppila et al., 1981; Blum et al., 1989).

Η κλομφαίνη χορηγείται συνήθως για 5 ημέρες αρχίζοντας από την 2η μέρα του εμμηνορρυσιακού κύκλου, ο οποίος μπορεί να είναι αυτόμα-

τος ή εκ διακοπής της προγεστερόνης. Η συνηθέστερη αρχικά χορηγούμενη δόση στις περισσότερες γυναίκες είναι τα 50 mg/ημέρα. Υψηλότερες δόσεις έχουν χρησιμοποιηθεί από πολλούς κλινικούς, όταν οι χαμηλότερες δόσεις αποτυγχάνουν να προκαλέσουν ωοθυλακιορρηξία. Αν και η ορμονική απάντηση στη θεραπεία ποικίλλει, γενικά παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της FSH και της LH κατά την περίοδο της χορήγησής της. Η μη ενιαία απάντηση των γοναδοτροπινών στη χορήγηση της κλομιφαίνης ίσως να οφείλεται στην πολυπλοκότητα του υποθαλαμο-υποφυσιο-ωοθηκικού άξονα και στις ποικίλες μορφές της ανωοθυλακιορρηκτικής δυσλειτουργίας.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η κλομιφαίνη ασκεί τη δράση της δεν είναι απόλυτα κατανοητός και αναμφίβολα υπάρχουν πολύπλοκοι μηχανισμοί, μέσω των οποίων ασκούν τη δράση τους οι ενδογενείς ορμόνες. Η πιο συνήθης εξήγηση βασίζεται πάνω στις αντιοιστρογονικές ιδιότητες του φαρμάκου και εστιάζεται στην ικανότητα της κλομιφαίνης να συνδέεται με τους οιστρογονικούς υποδοχείς και να εμποδίζει την αρνητική παλίνδρομη δράση που τα οιστρογόνα ασκούν στον υποθάλαμο και στην υπόφυση (Clark et al., 1982).

Η αδυναμία κατάδειξης ύπαρξης οιστρογονικών υποδοχέων μέσα στους νευρώνες από τους οποίους εκλύεται η GnRH συνηγορεί υπέρ του ότι ίσως οι νευρώνες-στόχοι να είναι μη-GnRH, αλλά κατεχολαμινεργικοί. Η κλομιφαίνη δρώντας ως αντιοιστρογόνο πιστεύεται πως αντικαθιστά τα ενδογενή οιστρογόνα από τα σημεία του υποθαλάμου, που αυτά συνδέονται με τους οιστρογονικούς υποδοχείς. Το γεγονός αυτό, από άποψη λειτουργίας του υποθαλάμου, έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση των αρνητικών παλίνδρομων σημάτων που ασκούν τα ενδογενή οιστρογόνα στον υποθάλαμο με συνέπεια προφανώς τη μεταβολή στα χαρακτηριστικά της έκκρισης της GnRH. Αυτή η μεταβολή στα χαρακτηριστικά έκκρισης της GnRH οδηγεί σε «ομαλοποίηση» της απελευθέρωσης των γοναδοτροπινών από την υπόφυση που συνεπάγεται την επιλογή, κυριαρχία και τελικά τη ρήξη του επιλεγμένου ωοθυλακίου (Adashi, 1984).

Οι Miyake et al. (1983) σε μία πειραματική μελέτη με υποθαλάμους και υποφύσεις αρουραίων έδειξαν πως: α) η κλομιφαίνη προκαλεί απελευθέρωση της GnRH από το μεσοβασικό πυρήνα του υποθαλάμου, η οποία μπορεί να επάγει την έκλυση της LH κατά ένα μέρος, δρώντας απευθείας στο επίπεδο της υπόφυσης και β) οι μεταβολές στην LH μετά τη χορήγηση της κλομιφαίνης συμβαίνουν ταυτό-

χρονα με την έκλυση της GnRH.

Κατά τους Clark et al. (1982) και ο υποθάλαμος και η υπόφυση είναι θέσεις, στις οποίες ασκεί τη δράση της η κλομιφαίνη. Κατά τους ίδιους συγγραφείς η εξήγηση του μηχανισμού της δράσης της με βάση τις αντιοιστρογονικές ιδιότητες φαίνεται να έχει κάποια βάση, πάντως είναι ανεπαρκής και αγνοεί κάποια στοιχεία από τη βασική φαρμακολογία της κλομιφαίνης.

Ίσως εδώ θα πρέπει να αναφερθούν τα αποτελέσματα μίας πρόσφατης μελέτης των Gagas et al. (2004), η οποία έδειξε πως τόσο η ραλοξιφαίνη όσο και η κλομιφαίνη πιθανόν να επηρεάζουν την έκλυση των γοναδοτροπινών από τη υπόφυση μέσω μηχανισμών στους οποίους δεν συμμετέχουν οι πυρηνικοί οιστρογονικοί υποδοχείς.

Οι Taubert et al. (1976) έδειξαν πως υψηλές δόσεις αιθυνυλοιστραδιόλης χορηγούμενες από τη 10η-17η ημέρα του κύκλου και όταν έχει προηγηθεί η χορήγηση κλομιφαίνης κατά την 5η-9η ημέρα, δεν επηρέασαν την ικανότητα της κλομιφαίνης να προκαλέσει ωοθυλακιορρηξία.

Η αιθυνυλοιστραδιόλη είναι γνωστό πως έχει αρνητική παλίνδρομη δράση στην έκκριση των γοναδοτροπινών στον άνθρωπο. Οι Vaitukaitis et al. (1970) έδειξαν πως η κλομιφαίνη ανταγωνίζεται τα οιστρογόνα στους οιστρογονικούς υποδοχείς του υποθαλάμου και της υπόφυσης και έτσι εμποδίζει τη δράση της αιθυνυλοιστραδιόλης, υπό ορισμένες συνθήκες.

Το ότι η κλομιφαίνη φαίνεται να δρα μέσω της δέσμευσης των οιστρογονικών υποδοχέων του υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα προκύπτει και από τη μελέτη των Messinis and Templeton (1988), οι οποίοι χορήγησαν σε 5 γυναίκες με φυσιολογική ωοθυλακιορρηξία κατά τη διάρκεια δύο κύκλων 100mg κλομιφαίνης/ημέρα. Στη διάρκεια του πρώτου κύκλου η κλομιφαίνη χορηγήθηκε κατά τις ημέρες 2-6, ενώ στη διάρκεια του δεύτερου κύκλου κατά τις ημέρες 2-16. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν πως κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου τα επίπεδα της LH ήταν παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στους αυτόματους κύκλους, η ενδογενής αιχμή της LH ήταν παρούσα σε όλες τις γυναίκες και διαπιστώθηκε φυσιολογική ωοθυλακιορρηξία με φυσιολογική ωορρινική λειτουργία. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια του δεύτερου κύκλου παρατηρήθηκε μία συνεχόμενη και προοδευτική άνοδος των επιπέδων της LH, χωρίς ενδογενή αιχμή, που είχε ως αποτέλεσμα την ωορρινοποίηση του ωοθυλακίου χωρίς ωοθυλακιορρηξία.

Επίσης, είναι γνωστό πως η κλομιφαίνη καταστέλ-

λει την έκκριση των γοναδοτροπινών στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ή στις γυναίκες που έχουν υποβληθεί σε ωθηκεκτομή (Czygan et al., 1972; Hashimoto et al., 1976; Ravid et al., 1977). Φαίνεται πως υπό ορισμένες συνθήκες η κλομφαίνη δρα οιστρογονικά και μμείται την αρνητική παλίνδρομη δράση που ασκούν τα οιστρογόνα στις γοναδοτροπίνες. Οι Czygan et al., (1972) παρατήρησαν πως σε μερικές μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων, η χορήγηση κλομφαίνης προκαλούσε αύξηση των επιπέδων των γοναδοτροπινών, γεγονός που τους οδήγησε στο συμπέρασμα πως η δράση της κλομφαίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών εξαρτάται κυρίως από τα ενδογενή επίπεδα οιστρογόνων.

Η κλομφαίνη, όπως και οι υπόλοιποι SERMs, έχει στον άνθρωπο τόσο οιστρογονική όσο και αντιοιστρογονική δράση. Επίσης, από τα παραπάνω διαπιστώνεται πως η αρνητική παλίνδρομη δράση της κλομφαίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών ασκείται όταν η ουσία χορηγείται σε γυναίκες που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση ή έχουν υποβληθεί σε ωθηκεκτομή. Αντίθετα, στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας που τα επίπεδα των ενδογόνων οιστρογόνων είναι αυξημένα, η χορήγηση της κλομφαίνης προκαλεί άνοδο των επιπέδων των γοναδοτροπινών. Αυτές οι δύο υποθαλαμο-υποφυσιακές καταστάσεις είναι προφανώς μη συγκρίσιμες, σε ό,τι αφορά στο μηχανισμό δράσης της κλομφαίνης. Έτσι, όταν σε μία μετεμμηνοπαυσιακή γυναίκα ή σε μία γυναίκα που έχει υποβληθεί σε ωθηκεκτομή χορηγηθούν οιστρογόνα ή κλομφαίνη, σε άλλοτε άλλο βαθμό, προκαλείται μείωση των επιπέδων των γοναδοτροπινών. Όταν η κλομφαίνη χορηγηθεί σε γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας με φυσιολογικά επίπεδα οιστρογόνων, τότε προκαλεί αύξηση της έκκρισης των γοναδοτροπινών. Άρα, για να ασκήσει η κλομφαίνη την οιστρογονική δράση της πάνω στην έκκριση των γοναδοτροπινών, απαιτείται η παρουσία βασικών επιπέδων οιστρογόνων (Czygan et al., 1972; Hashimoto et al., 1976; Messinis and Templeton, 1988; de Moura et al., 1992).

β) Η δράση της ταμοξιφαίνης

Η ταμοξιφαίνη χρησιμοποιείται σε περιορισμένη έκταση για την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας αφού δρα με τον ίδιο μηχανισμό με αυτόν της κλομφαίνης, δηλαδή αντιοιστρογονικά στο επίπεδο του υποθαλάμου-υπόφυσης. Οι Messinis and Nillius (1982) χορήγησαν σε γυναίκες με ανωοθυλακιορρηκτική υπογονιμότητα – εναλλασσόμενα κατά

τους διαφορετικούς μήνες αγωγής- ταμοξιφαίνη ή κλομφαίνη για την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας και διαπίστωσαν πως στις υπό μελέτη γυναίκες η πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ αυτών που έλαβαν ταμοξιφαίνη ή κλομφαίνη.

Σε μερικές μελέτες έχει φανεί πως η ταμοξιφαίνη προκαλεί ελάχιστη ή καμία αύξηση στα επίπεδα των γοναδοτροπινών, αν και μία άλλη μελέτη δείχνει πως η χορήγησή της προκάλεσε μεγάλη αύξηση στα επίπεδα της FSH και καμία μεταβολή στα επίπεδα της LH (Baker et al., 1995). Οι Jordan et al., (1991) διαπίστωσαν πως η ταμοξιφαίνη δεν επηρέασε τα επίπεδα των γοναδοτροπινών σε μία ομάδα γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας με καρκίνο του μαστού, που λάμβανε το φάρμακο σαν συμπληρωματική θεραπεία.

Οι Lonning et al. (1995) που μελέτησαν τις μεταβολές στο ορμονικό προφίλ των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με καρκίνο του μαστού, πριν και μετά τη χορήγηση ταμοξιφαίνης, διαπίστωσαν πως η ταμοξιφαίνη προκάλεσε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό πτώση των επιπέδων της FSH και της LH σε ποσοστό 45.5% και 48.1%, αντίστοιχα.

γ) Η δράση της ραλοξιφαίνης

Τα περισσότερα στοιχεία που έχουμε για τη δράση της ραλοξιφαίνης πάνω στο υποθαλαμο-υποφυσιακό σύστημα προέρχονται από πειραματικές μελέτες σε ζώα. Οι Clemens et al. (1983) χορήγησαν οιστραδιόλη σε αρουραίους που είχαν υποβληθεί σε ωθηκεκτομή, η οποία προκάλεσε μείωση των πρωινών και αύξηση των απογευματινών επιπέδων της LH. Η προσθήκη ραλοξιφαίνης εμπόδισε την πρωινή πτώση των επιπέδων της LH που προκάλεσε η οιστραδιόλη, ενώ δεν εμπόδισε την απογευματινή άνοδο αυτών. Οι Simard et al. (1985) διαπίστωσαν πως η προσθήκη ραλοξιφαίνης σε καλλιέργειες κυττάρων από την πρόσθια υπόφυση αρουραίων, τα οποία είχαν επωαστεί προηγουμένως με οιστραδιόλη, εμπόδισε την αύξηση τόσο της βασικής όσο και της μετά από χορήγηση GnRH αύξηση της απελευθέρωσης της LH, που προκάλεσε φυσιολογικά η χορήγηση οιστραδιόλης.

Τόσο τα παραπάνω ευρήματα όσο και αυτά της μελέτης των Ortmann et al. (1988) που επίσης χρησιμοποίησαν καλλιέργειες κυττάρων από την πρόσθια υπόφυση ωθηκεκτομηθέντων αρουραίων, δείχνουν πως η ραλοξιφαίνη ασκεί αντιοιστρογονική δράση στα γοναδοτρόπα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης των αρουραίων, όταν συνυπάρχει οιστρογονικό περιβάλλον.

Επίσης, σε μία *in vitro* μελέτη βρέθηκε πως η ραλοξιφαίνη ασκεί σε κύτταρα του υποθαλάμου, τα οποία έχουν επωαστεί προηγουμένως για δύο ημέρες με οιστραδιόλη, μείωση των υποδοχέων της προγεστερόνης, δράση που χαρακτηρίζεται από τους συγγραφείς ως αντιστρογονική (Fitzpatrick et al., 1999).

Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, οι Pinilla et al. (2001) χορήγησαν ραλοξιφαίνη σε αρουραίους οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε ωθηκεκτομή και εξέτασαν τη δράση της στην υποθαλαμο-υποφυσιακή μονάδα. Διαπίστωσαν πως η ραλοξιφαίνη ανέστειλε την υπερέκκριση της LH, που παρατηρείται στους ωθηκεκτομηθέντες αρουραίους και αύξησε την έκκριση της PRL. Και τα δύο αυτά ευρήματα είναι ενδεικτικά μίας οιστρογονικής δραστηριότητας της ραλοξιφαίνης, όσον αφορά στην έκκριση της LH και της PRL σε ωθηκεκτομηθέντες θήλειους αρουραίους.

Για τη δράση της ραλοξιφαίνης στον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα των γυναικών της αναπαραγωγικής ηλικίας υπάρχει μόνο μία σχετική μελέτη των Baker et al. (1998). Κατά τη μελέτη αυτή, χορηγήθηκε ραλοξιφαίνη σε δύο ομάδες γυναικών, που σε προηγούμενους κύκλους είχαν διαπιστωμένα φυσιολογική ωοθυλακιορρηξία. Στη μία ομάδα η ραλοξιφαίνη χορηγήθηκε για χρονικό διάστημα πέντε ημερών κατά την ωοθυλακική ή την περιωοθυλακιορρηκτική φάση και στην άλλη ομάδα για χρονικό διάστημα 28 ημερών, σε δύο διαφορετικές δόσεις και μελετήθηκε η δράση της στο ορμονικό προφίλ και στο ενδομήτριο. Οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η ραλοξιφαίνη στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας φαίνεται να έχει οιστρογονική δράση όσον αφορά στη σύνθεση της SHBG από το ήπαρ και αντιστρογονική δράση στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση, η οποία δεν αναστέλλει την ωοθυλακιορρηξία. Πιο συγκεκριμένα, σε ό,τι αφορά στο ορμονικό προφίλ των υπό μελέτη γυναικών, η ραλοξιφαίνη φάνηκε να αυξάνει ή να αφήνει αμετάβλητα τα επίπεδα της FSH και να μειώνει σε ορισμένες περιπτώσεις τα επίπεδα της PRL, δράσεις που αμφότερες συνηγούν υπέρ μίας αντιστρογονικής δράσης στο επίπεδο του υποθαλάμου και της υπόφυσης.

Πρόσφατα δημοσιεύτηκαν δύο μελέτες (Reindollar et al., 2002 και Lasco et al., 2002), οι οποίες εστίασαν στην επίδραση της ραλοξιφαίνης στα βασικά επίπεδα των γοναδοτροπινών ορμονών ενώ η μία μελέτησε και τη δράση της στην έκκριση της προλακτίνης στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Και στις δύο μελέτες συμμετείχαν μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Στη μία ομάδα οι γυναίκες λάμβαναν για θεραπεία

οστεοπόρωσης ραλοξιφαίνη 60mg/ημέρα για 3-6 μήνες, ενώ η άλλη ομάδα χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου. Η μία μελέτη (Reindollar et al., 2002) διαπίστωσε πως στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, μετά από 3 μήνες χορήγησης ραλοξιφαίνης υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της SHBG (sex hormone binding globulin) και της TBG (thyroxine-binding globulin), ενώ τα επίπεδα της FSH μειώθηκαν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($P=0.019$). Η άλλη μελέτη (Lasco et al., 2002) καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η ραλοξιφαίνη χορηγούμενη για χρονικό διάστημα 6 μηνών στην παραπάνω δόση δεν προκάλεσε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μεταβολή των επιπέδων της FSH και της LH, ενώ προκάλεσε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό πτώση των επιπέδων της προλακτίνης. Σε ό,τι αφορά στην επίδραση της ραλοξιφαίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών ορμονών σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με αυτά δικής μας πρόσφατης μελέτης, η οποία έδειξε πως η χορήγηση ραλοξιφαίνης για χρονικό διάστημα ενός μήνα σε δόση 180 mg/ημέρα δεν μετέβαλε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό τα επίπεδα της βασικής έκκρισης της FSH και LH ακόμη και όταν κατά το τελευταίο δεκαήμερο συγχορηγήθηκε και οιστραδιόλη διαδερμικά, σε δόση 100μg/ημέρα. Αντίθετα, όταν ραλοξιφαίνη και κλομφαίνη χορηγήθηκαν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους στις ίδιες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες μετά από προθεραπεία με οιστραδιόλη, η δράση τους ήταν αντιστρογονική (Garas et al., 2004).

Συμπεράσματα

Οι SERMs αποτελούν μία ενδιαφέρουσα και κλινικά χρήσιμη ομάδα ουσιών, οι οποίες ασκούν αγωνιστική ή ανταγωνιστική δράση στους οιστρογονικούς υποδοχείς. Ο μηχανισμός με τον οποίο το σύμπλεγμα SERM-οιστρογονικός υποδοχέας ή οιστρογόνο-οιστρογονικός υποδοχέας ασκεί τη δράση του στο υποθαλαμο-υποφυσιακό σύστημα δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός και φαίνεται πως η κάθε ουσία ασκεί διαφορετική δράση. Επίσης, οι νεότερες μελέτες που δείχνουν πως τόσο τα οιστρογόνα όσο και τα SERMs μπορεί να ασκούν τη δράση τους και μέσω μηχανισμών στους οποίους δεν συμμετέχουν οι οιστρογονικοί υποδοχείς (nongenomic), κάνουν μεγαλύτερη την ανάγκη σχεδιασμού μελετών που θα μας βοηθήσουν να κατανοήσουμε περαιτέρω τη δράση των ουσιών αυτών.

Effects of SERMs on gonadotrophin secretion

A. Garas, A. Kallitsaris, I. E. Messinis

Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Thessalia, Larissa, Greece

Correspondence: Antonis Garas, Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Thessalia, University General Hospital of Larissa, 41110, Larissa, Greece, Tel:0030 2410 682795, Fax: 00302410 670096, E-mail:garasant@yahoo.gr

Summary

Oestrogens are predominant regulators of gonadotrophin secretion during the reproductive years. However, the descriptions of a gene encoding a second type of oestrogen receptor, termed ER- β , has prompted a reexamination of the oestrogen signalling system and hence of the mechanisms that regulate the gonadotrophin secretion. Recent studies have shown that oestrogens may also exert biological effects through nongenomic pathways. SERMs are an interesting and clinically useful class of compounds that exert mixed oestrogen agonistic and antagonistic properties, depending on the specific target-tissue. They exert their action through oestrogen receptors and they appear to have different effect on gonadotrophin secretion. Clomiphene, which has been extensively investigated for its effect on the gonadotrophin secretion seems to exert an antioestrogenic activity in women of reproductive age. In postmenopausal women clomiphene demonstrates oestrogenic activity on the hypothalamic-pituitary axis. Tamoxifen demonstrates a similar to clomiphene activity on gonadotrophin secretion. Raloxifene, seems to have antioestrogenic activity in women of reproductive age. In postmenopausal women, following raloxifene administration, the levels of gonadotrophins remain unchanged or decline slightly, action indicative of an estrogenic activity. Additionally, recent findings suggest that SERMs may act on the hypothalamic-pituitary axis through mechanisms that they do not involve the nuclear receptors (non-genomic action). More studies are needed in order to obtain further insights into the role of oestrogenic mechanisms in hypothalamic-pituitary interaction.

Key words: oestrogen receptors, raloxifene, clomiphene, gonadotrophins, SERMs

Βιβλιογραφία

- Adashi, E.Y. (1984) Clomiphene citrate: mechanism(s) and site(s) of action-a hypothesis revisited. *Fertil. Steril.* 42, 331-343.
- Baker, V.L., Draper, M., Paul S. et al. (1998) Reproductive Endocrine and Endometrial Effects of Raloxifene HCL, a Selective Estrogen Receptor Modulator, in Women With Regular Menstrual Cycles. *J. Clin. Endocr. Metab.* 83, 6-13.
- Baker, V.L. and Jaffe, R.B. (1995) Clinical uses of antiestrogens. *Obstet. Gynecol. Surv.* 51, 45-59.
- Blum, M., Zacharovitch, D., Pery, J. and Gilerowitch, M. (1989) Estrogen replacement therapy (ERT) by a special regimen in the years following menopause. *Clin. Exp. Obstet. Gynec.* XVI, 9-11.
- Cambiasso, M.J. and Carrer, H.F. (2001) Nongenomic mechanism mediates estradiol stimulation of axon growth in male rat hypothalamic neurons in vitro. *J. Neurosci. Res.* 66, 475-481.
- Chaidarum, S.S., Swearingen, B. and Alexander, J.M. (1998) Differential expression of estrogen receptor-beta (ER-beta) in human pituitary tumors: functional interaction with ER alpha and a tumor-specific splice variant. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 3308-3315.
- Clark, J.H. and Markaverich, B.M. (1982) The agonistic-antagonistic properties of clomiphene: a review. *Pharmac. Ther.* 15,467-519.
- Clemens, J.A., Bennett, D.R., Black, L.J. and Jones, C.D. (1983) Effects of a new antiestrogen, keoxifene (LY 156758), on growth of carcinogen-induced mammary tumors and on LH and prolactin levels. *Life Sciences*, 32, 2869-2875.
- Czygan, P.J. and Schultz, K.D. (1972) Studies of the Anti-Oestrogenic and Oestrogen-Like Action of Clomiphene Citrate in Women. *Gynec. Invest.* 3, 126-134.
- de Moura, M.D., Ferriani, R.A. and de Sa, M.F. (1992) Effects of clomiphene citrate on pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in women before and after treatment with ethinyl estradiol. *Fertil. Steril.* 58, 504-507.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (1998) Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet*, 351, 1451-1467.
- Fitzpatrick, S.L., Berrodin, T.J., Jenkins, S.F. et al. (1999) Effect of estrogen agonists and antagonists on induction of progesterone receptor in a rat hypothalamic cell line. *Endocrinology*, 140, 3928-3937.
- Friend, K.E., Chiou, Y.-K., Lopes, M.B.S. et al. (1994) Estrogen receptor expression in human pituitary: correlation with immunohistochemistry in normal tissue and immunohistochemistry and morphology in macroadenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 1497-1504.

- Garas, A., Trypsianis, G., Kallitsaris, A. et al. (2004) Effects of clomiphene and raloxifene on gonadotrophin secretion in postmenopausal women: evidence of nongenomic action. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 61, 256-262.
- Hashimoto, T., Miyai, K., Izumi, K. and Kumahara, Y. (1976) Effect of Clomiphene Citrate on Basal and LRH-Induced Gonadotropin Secretion in Postmenopausal Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42, 539-540.
- Hashimoto, T., Miyai, K., Izumi, K. et al. (1976) Dual Effect of Clomiphene Citrate on Pituitary Gonadotropin Secretion in Postmenopausal Women. *Endocrinol. Japon*, 23,115-118.
- Jordan, V.C., Fritz, N.F., Langan-Fahey, S. et al. (1991) Alteration of endocrine parameters in postmenopausal women with breast cancer during long term adjuvant therapy with tamoxifen as the single agent. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 1488-1491.
- Kaupilla, A., Janne, O., Kivinen, S. et al. (1981) Postmenopausal hormone replacement therapy with estrogen periodically supplemented with antiestrogen. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 140,787-792.
- Lasco, A., Cannavo, S., Gaudio, A. et al. (2002) Effects of long term raloxifene treatment on serum prolactin and gonadotropin levels in postmenopausal women. *Eur. J. Endocrinol.* 147, 461-465.
- Lonning, P.E., Johannessen, D.C., Lien, E.A. et al. (1995) Influence of tamoxifen on sex hormones, gonadotrophins and sex hormone binding globulin in postmenopausal breast cancer patients. *J. Steroid Molec. Biol.* 52, 491-496.
- McDonnell, D.P., Clemm, D.L., Hermann, T. et al. (1995) Analysis of Estrogen Receptor Function in Vitro Reveals Three Distinct Classes of Antiestrogens. *Mol. Endocrinol.* 9, 659-669.
- Messinis, I.E. and Milingos, S.D. (1997) Current and future status of ovulation induction in polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod. Update*, 3, 235-53.
- Messinis, I.E. and Templeton, A. (1988) Blockage of the positive feedback effect of oestradiol during prolonged administration of clomiphene citrate to normal women. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 29, 509-516.
- Meunier, P.J., Vignot, E., Garnerio, P. et al. (1999) Treatment of Postmenopausal Women with Osteoporosis or Low Bone Density with Raloxifene. *Osteoporos. Int.* 10, 330-336.
- Milner, T.A., McEwen, B.S., Hayashi, S. et al. (2001) Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J. Comp. Neurol.* 15; 429, 355-371.
- Mitchner, N.A., Garlick, C. and Ben-Jonathan, N. (1998) Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology*, 139, 3976-3983.
- Miyake, A., Tasaka, K., Sakumoto, T. et al. (1983) Clomiphene citrate induces luteinizing hormone release through hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone in vitro. *Acta Endocrinologica (Copenh.)*, 103, 289-292.
- Ortmann, O., Emons, G., Knuppen, R. and Catt, K. (1988) Inhibitory Action of Keoxifene on Luteinizing Hormone Secretion in Pituitary Gonadotrophins. *Endocrinology*, 123,962-968.
- Petterson, K., Grandien, K., Kuiper, G.G. and Gustafsson, J.A. (1997) Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol. Endocrinol.* 11, 1486-1496.
- Pinnila, L., Gonzalez, L.C., Gaytan, F. et al. (2001) Oestrogenic effects of neonatal administration of raloxifene on hypothalamic-pituitary-gonadal axis in male and female rats. *Reproduction*, 121,915-924.
- Pinnila, L., Gonzalez, L.C., Tena-Sempere, M. and Aguilar, E. (2001). Evidence of an estrogen-like action of raloxifene upon the hypothalamic-pituitary unit: raloxifene inhibits luteinizing hormone secretion and stimulates prolactin secretion in ovariectomized female rats. *Neuroscience Letters*, 311, 149-152.
- Reindollar, R., Koltun, W., Parsons, A. et al. (2002) Effects of oral raloxifene on serum estradiol levels and other markers of estrogenicity. *Fertil. Steril.* 78, 469-472.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V. and Merchenthaler, I. (1997) Comparative distribution of estrogen receptors α and β mRNA in the rat central nervous system. *Compar. Neurol.* 388, 507-525.
- Shupnik, M.A. (2002) Estrogen receptors, receptor variants and estrogen actions in the hypothalamic-pituitary axis. *J. Neuroendocrinol.* 14, 85-94.
- Shupnik, M.A., Pitt, L.K., Soh, A.Y. et al. (1998) Selective expression of estrogen receptor α and β isoforms in human pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 3965-3972.
- Simard, J. and Labrie, F. (1985) Keoxifene shows pure antiestrogenic activity in pituitary gonadotrophs. *Mol. Cell. Endoc.* 39, 141-144.
- Taubert, H-D. and Dericks-Tan, J.S.E. (1976) High doses of estrogens do not interfere with the ovulation-inducing effect of clomiphene citrate. *Fertil. Steril.* 27, 375-382.
- The Surgical Clinics of North America, "Breast Cancer Management". October 1999, 79,5.
- Vaitukaitis, J.L., Bermudez, J.A., Cargille, C.M. et al. (1970) New Evidence of an Anti-estrogenic Action of Clomiphene Citrate in Women. *J. Clin. Endocr. Metabol.* 32, 503-508.