

La regulación neuroendocrina de la pubertad normal y precoz: nuevos genes y nuevos conceptos

S.R. Ojeda

Division of Neuroscience, Oregon National Primate Research Center/Oregon Health & Science University, Oregon, USA.

INTRODUCCIÓN

Para que se inicie la pubertad en los mamíferos, se requiere un aumento de la secreción pulsátil de GnRH (gonadotropin releasing hormone) desde el hipotálamo. Este cambio tiene un ritmo circadiano, y lleva a la adenohipófisis a producir más gonadotropinas, que también se secretan de manera circadiana^{1,2}. El aumento de secreción de GnRH a su vez, viene determinado por un sistema regulador que recibe señales transinápticas y gliales, que modifican la función de las neuronas GnRH. Las señales transinápticas pueden ser tanto estimuladoras como inhibitoras. Las primeras son dadas por aminoácidos estimuladores^{2,3}, sorprendentemente el GABA^{4,5}, y el neuropéptido recientemente identificado, metastina/kisspeptina^{6,7}. Las señales inhibitoras son principalmente el GABA (actuando sobre las redes neuronales conectadas a las neuronas GnRH), y péptidos opioides^{8,9}. Además de esta regulación transináptica, la secreción de GnRH se favorece por señales moleculares intercelulares de origen glial¹⁰. Entre estas moléculas destacan los factores de crecimiento que actúan vía receptores serina treonina quinasa, como el TGF β 1 (transforming growth factor beta-1), el IGF-I (insulin-like growth factor I), el bFGF (basic fibroblast growth factor), y los miembros de la familia de los factores de crecimiento epidérmicos, el TGF α (transforming growth factor alpha), y las neuregulinas (NRGs)¹⁰.

La actividad neuronal responsable del aumento de secreción pulsátil de GnRH en la pubertad se conoce como “central drive”, o “conductor central”^{9,11,12}. Este

evento parece ser iniciado por dos mecanismos complementarios: una pérdida del tono GABAérgico inhibitor transináptico⁹, y la activación de las señales favorecedoras hacia la red neuronal de las neuronas GnRH^{2,3}. Mientras que la importancia de la pérdida del tono inhibitorio, elegantemente demostrada en primates no humanos, aun no se ha demostrado en roedores², el papel que desempeñan los estímulos favorecedores a las neuronas GnRH esta bien establecido – y se sabe que proceden tanto de señales transinápticas, como de la glía.

AUMENTO DE SEÑALES TRANSINÁPTICAS EXCITATORIAS

Como se indicó anteriormente, las señales transinápticas favorecedoras proceden principalmente de neuronas glutamatérgicas y neuronas kisspeptin.

Neuronas glutamatérgicas

La importancia fisiológica de la transmisión glutamatérgica en el inicio de la pubertad, ha sido demostrada en numerosos estudios. Para empezar, la activación de los receptores NMDA mediante la administración de éste, aumenta la secreción de GnRH¹³ y adelanta la pubertad tanto en ratas como en monos^{14,15}. A su vez, el bloqueo de estos receptores por un antagonista no competitivo, retrasa la pubertad en ratas hembra¹⁵. Otros estudios han demostrado un aumento de la actividad de los receptores NMDA hipotalámicos en el comienzo de la pubertad¹⁶, y que esta activación no depende de las gónadas¹⁷. Se ha demostrado un aumento

Correspondencia: Dr. Sergio R. Ojeda.

Division of Neuroscience, Oregon National Primate Research Center/Oregon Health & Science University, 505 N.W. 185th Avenue, Beaverton, Oregon, Usa.
Correo electrónico: ojeda@ohsu.edu

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por las subvenciones HD25123, MH65438, HD050798 y, RR00163 del NIH (Nacional Institutes of Health) y a través de los acuerdos cooperativos U-54 HD18185 como parte del Programa de Centros Cooperativos Especializados en la Investigación de la Reproducción.

en el número de neuronas GnRH que expresan receptores NMDA, en relación con la pubertad¹⁸, y otros estudios han demostrado que un número importante (el 80%) de neuronas GnRH del área preóptica media de ratas adultas, expresan el ARNm que codifica la subunidad obligatoria del receptor NMDAR1¹⁹. Las neuronas glutamatérgicas también utilizan receptores kainato en la regulación de la secreción de GnRH^{20,21}. Durante el desarrollo prepuberal de la rata hembra, cerca del 50% de las neuronas GnRH expresan el ARNm codificante de la subunidad KA2 del receptor glutamato kainato-preferente²². Las neuronas GnRH también expresan ARNm del GluR5²³, que codifica una subunidad del receptor necesaria para el ensamblaje heterodimérico de canales de kainato de alta afinidad²⁴. La importancia de la neurotransmisión glutamatérgica en la regulación estimuladora para el comienzo de la pubertad, queda demostrada por el hecho de que el bloqueo de la síntesis endógena de glutamato en el hipotálamo de la rata durante el desarrollo embrionario, induce una pérdida de la pulsatilidad de la GnRH²⁵. Sorprendentemente, a pesar de los hallazgos mencionados, según un reciente estudio, las hembras de ratones carentes de receptores NMDA, o de la subunidad B esencial del receptor AMPA en neuronas GnRH y otras neuronas del sistema límbico, son fértiles²⁶.

Neuronas de Kisspeptina

Tanto en ratas²⁷ como en primates no humanos²⁸, en la pubertad aumenta el contenido de ARNm de Kiss1 y GPR54 en el hipotálamo, lo que sugiere un aumento de la actividad del complejo de señalización kisspeptina-GPR54 en la pubertad. Otros estudios respaldan esta idea mostrando que la kisspeptina administrada centralmente adelanta la apertura de la vagina en ratas, signo de inicio puberal en esta especie^{29,30}. La activación puberal del sistema kisspeptina/GPR54 parece tener lugar a dos niveles deferentes pero complementarios. Por una parte aumenta notablemente el número de neuronas del AVPV que contienen el ARNm de Kiss1 en el ratón adulto con respecto a los animales juveniles³¹, sin cambios en el número de neuronas GnRH que expresan ARNm de GPR54, ni en la cantidad de ARNm de GPR54 por neurona³¹. Por otra parte, el número de neuronas GnRH que responden a kisspeptina despolarizándose aumenta durante la transición de la etapa prepuberal a la adulta del ratón, indicando que la pubertad se asocia a un incremento en la habilidad de señalización del receptor³¹.

DISMINUCIÓN DE LAS SEÑALES TRANSINÁPTICAS INHIBIDORAS

Como se indicó anteriormente, estudios en monos rhesus han demostrado que una disminución en el control inhibitorio GABAérgico desempeña un papel im-

portante en contener el comienzo de la pubertad en esta especie⁸. Ha sido difícil desvelar esta influencia en la rata, que aparentemente puede responder a las manipulaciones del sistema GABA tanto aumentando como disminuyendo la secreción de GnRH y gonadotropinas, según las condiciones experimentales [revisado en referencia 2]. Aparte de estas inconsistencias, parece claro que el pico preovulatorio en la rata está precedido por una disminución de la liberación de GABA^{32,33}. La actividad de los demás sistemas principales inhibidores, representados por neuronas que emplean péptidos opioides en neurotransmisión y neuromodulación, también disminuye los días que preceden a la primera ovulación³⁴. Esta disminución es más marcada por las tardes en el periodo peripuberal³⁵.

LA COORDINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL CONTROL ESTIMULADOR E INHIBIDOR

Aunque la importancia de las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas en el control de la pubertad es incuestionable, aún no está claro qué cambio ocurre primero, si el aumento en el flujo de glutamato, o la disminución del tono GABAérgico inhibitorio^{2,3}. Los dos sistemas están estrechamente relacionados, puesto que el glutamato es el precursor natural en la síntesis de GABA. Dado que la actividad sináptica de las neuronas GABAérgicas está regulada extensamente por neuronas glutamatérgicas [ver por ejemplo referencias 36 y 38], pensamos que en la rata, la activación de la transmisión glutamatérgica puede preceder a la pérdida del tono GABAérgico inhibitorio. Este concepto está respaldado por hallazgos que muestran que la activación tanto de receptores kainato como AMPA, inhiben la liberación de GABA en otras áreas del cerebro de la rata³⁷⁻⁴⁰.

Durante el desarrollo postnatal temprano, la mayoría de las sinapsis GABAérgicas son estimuladoras, pero después de la primera semana de vida se vuelven inhibitorias^{41,42}. En este momento también se desarrollan sinapsis glutamatérgicas funcionales^{43,44}. Por lo tanto, en la etapa juvenil, las neuronas GnRH están sometidas a la influencia inhibitoria GABAérgica. No obstante, una señal estimuladora directa, mediada por el receptor GABA_A puede permanecer operativa durante la pubertad^{4,5,45}, a pesar del cambio de estimulador a inhibitorio que ha lugar en otras áreas del cerebro al final del desarrollo infantil. Otros autores defienden que el cambio está en la respuesta de las neuronas GnRH, que pasa de ser despolarización a hiperpolarización durante la pubertad^{46,47}. Resolver esta controversia precisa investigación adicional.

Otra cuestión importante que también espera ser resuelta, es si los cambios en la expresión de Kiss1, o la capacidad de las neuronas GnRH de responder a la kisspeptina está influenciada por señales glutamatérgi-

cas y/o GABAérgicas. Es perfectamente plausible que las neuronas KISS1 reciban invasión glutamatérgica y GABAérgica y por tanto, estén reguladas por estos sistemas neurotransmisores.

CAMBIO EN LAS SEÑALES GLIALES

Existe una cantidad sustancial de evidencia que demuestran la crítica importancia del TGF α , NRGs y sus receptores erbB, en la cronología de la pubertad femenina^{2,10}. La actividad de este sistema parece estar coordinada al menos en parte, por neuronas glutamatérgicas⁴⁸. Cuando los astrocitos del hipotálamo son estimulados glutamato, estos responden reclutando receptores erbB-1 y erbB-4 y sus ligandos respectivos en su membrana celular, transactivando los receptores mediante un mecanismo que precisa actividad metaloproteína, e incrementando la expresión de receptores erbB-1 y erbB-2. Una de las actividades metaloproteasa involucrada ha sido recientemente identificada como ADAM 17/TACE⁴⁹, proteasa necesaria para eliminar los dominios externos de TGF α y NRGs. Estos estudios indican que el cerebro neuroendocrino emplea una vía glutamatérgica neurona-glia como mecanismo básico de comunicación, para coordinar las señales transinápticas y astrogliales favorecedoras a las neuronas GnRH durante el desarrollo sexual. Puesto que los astrocitos también potencian la transmisión sináptica inhibitoria GABAérgica⁵⁰ y se despolarizan al ser estimulados por GABA^{51,52}, parece claro que existe una comunicación dinámica bidireccional entre neuronas y células astrogliales que utilizan como neurotransmisores tanto aminoácidos estimuladores como inhibidores.

PAPEL INTEGRADOR DE REDES DE GENES

Aunque el concepto de “redes de genes” controlando la pubertad está apenas emergiendo, no sería poco razonable sugerir que la integración funcional de las redes neuronales y gliales que gobiernan el proceso puberal pueda estar determinado por un complicado conjunto de genes organizados jerárquicamente, y que funcionan en concierto⁵³. Con fines didácticos, estos genes se pueden clasificar en tres grupos principales: 1) *Genes Subordinados*, precisos para la comunicación intercelular, incluyendo todos los genes que contribuyen al control estimulador e inhibitorio de las neuronas GnRH, independientemente de que participen en la comunicación transináptica o de glía a neuronas.

Los genes subordinados podrían considerarse de forma mecánica como los “últimos en activarse”; de acuerdo con esto, su expresión está regulada hipotéticamente por genes en un nivel más alto en la jerarquía de la red. 2) *Genes de segundo nivel*, implicados en diversas funciones celulares necesarias para que las neuronas y la glía interactúen de manera productiva con otras neu-

ronas y otras células gliales que formen parte de la red, y 3) *Genes Controladores Superiores* que controlan la expresión de multitud de genes jerárquicamente por debajo suyo, a nivel de transcripción.

Mientras que la mayoría de “genes subordinados” han sido identificados mediante el enfoque convencional de “uno por uno”, el descubrimiento de los genes de segundo nivel y controladores superiores, está precisando el empleo de enfoques genómicos y proteómicos de alto rendimiento. Con estas estrategias hemos identificado en el hipotálamo del primate no humano, un grupo de genes que podrían constituir una red genética de segundo nivel implicada en la neuroregulación de la pubertad femenina⁵⁴. Aunque estos genes tienen diversas funciones celulares, todos comparten la característica común de haber sido descritos originalmente como involucrados en la “supresión tumoral”. Un ejemplo destacado de miembros de este grupo es el SynCAM⁵⁵, previamente descrito como “supresor tumoral en cáncer de pulmón-1” (TSLC1)⁵⁶, y que ahora se sabe que codifica una molécula de adhesión necesaria para la formación de sinapsis⁵⁷. Otro ejemplo es el sistema de señalización KISS1-GPR54. Antes de que se descubriera su papel en el control de la pubertad, el gen KISS1 era conocido como supresor de metástasis tumorales^{58,59}. Dado que la expresión de otros “genes supresores tumorales” en el hipotálamo aumenta al unísono con la expresión de SynCAM, KISS1 y GPR54 en la pubertad, es plausible que SynCAM, KISS1 y GPR54 sean componentes de una red de genes que, en lugar de suprimir la formación de tumores en el hipotálamo, sirvan para integrar la comunicación entre neuronas y entre éstas y la glía, en una red celular interactiva capaz de iniciar el proceso de la pubertad.

Bien empleando PCR con cebadores degradados⁶⁰, o selección de ADNc⁶¹⁻⁶³, hemos identificado tres genes que, según nuestros resultados, actúan como reguladores de transcripción del proceso puberal. Uno de ellos es el Oct-2, regulador transcripcional de la familia “POU-domain” de genes “homeobox”⁶⁴. Oct-2 transactiva el gen del TGF α en células astrogliales⁶⁰; retrasando el inicio de la pubertad cuando se impide su expresión con oligodeoxinucleótidos “antisense”⁶⁰. El segundo candidato es TTF-1, otro gen “homeobox”. TTF-1 es necesario para la morfogénesis del diencefalo⁶⁵; la delección condicionada del gen TTF-1 en los subconjuntos de neuronas del hipotálamo donde normalmente se expresa, resulta en retraso puberal, interrupción del ciclo estrogénico, y disminución de la capacidad reproductiva⁶¹. El tercer candidato es un gen conocido previamente como C14ORF4 (del inglés Chromosome 14 Open Reading Frame) (66), pero que ahora hemos llamado EAP-1 (del inglés Enhanced At Puberty)^{62,63}. Al igual que el TTF-1, el EAP-1 codifica una proteína nuclear, que se expresa en grupos de neuronas implicadas

en la estimulación e inhibición de la secreción de GnRH, como neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas, proencefalínérgicas y KISS1, además de las propias neuronas GnRH⁶³. Impidiendo la expresión del EAP-1 en el hipotálamo con ARNis se retrasa la pubertad y se interrumpe el ciclo estrogénico⁶³, indicando que la actividad transcripcional del EAP-1 es necesaria para el desarrollo cronológico normal de la pubertad, como ocurre con Oct-2 y TTF-1.

Basándose en estas observaciones, se puede vislumbrar un escenario donde una jerarquía de genes superiores, representados por TTF-1, Oct-2 y EAP-1, controlan el desarrollo puberal coordinando la actividad (y por tanto las interacciones) de numerosos conjuntos de neuronas y glía implicados en el control del desarrollo de la red neuronal GnRH.

POSIBLES DEFECTOS EN EL CONTROL NEURO-GLIAL QUE PODRÍAN PRODUCIR PUBERTAD PRECOZ CENTRAL

Conforme avanza nuestro conocimiento de los mecanismos centrales que controlan el comienzo de la pubertad, se va haciendo mas evidente que defectos a varios niveles de la red neuro-glial reguladora podrían contribuir a explicar las causas de la pubertad precoz idiopática de origen central en el humano. Un aumento autónomo de liberación de GnRH puede ser el resultado de defectos en cualquiera de las vías de señalización empleadas por las neuronas GnRH para responder a la multitud de señales que reciben de origen neuronal, glial y endocrino. La pubertad precoz también puede resultar de defectos en el control transináptico de la secreción de GnRH. Por ejemplo, la hiperglicemia no cetósica, anomalía metabólica originada por una incapacidad para metabolizar la glicina, un aminoácido que ayuda al glutamato a activar los receptores NMDA. Un paciente afecto de esta enfermedad mostró signos de desarrollo sexual en el primer año de vida⁶⁷. Puesto que la glicina *per se* es capaz de estimular la secreción pulsátil de GnRH *in vitro*⁶⁷, la precocidad de la pubertad en este paciente podría haber sido causada por un exceso de estimulación de la secreción de GnRH mediada por glicina/NMDA. Otro ejemplo implica un defecto en el sistema de señalización de kisspeptina/GPR; en numerosos pacientes con pubertad precoz central idiopática, se han descrito recientemente mutaciones del gen del GPR54 que aumentan la capacidad de señalización del receptor⁶⁸.

También se han descrito defectos transinápticos causantes de retraso puberal. Un caso bien conocido es el síndrome de Prader-Willi (SPW)^{69,70}, que puede originar retraso puberal, aparentemente debido a alteraciones en la transmisión GABAérgica, entre otras alteraciones.

Un defecto descrito más recientemente, pero mucho

más específico del control neuroendocrino del desarrollo sexual, es la pérdida de función del GPR54 causada por mutaciones en su gen, que resultan en hipogonadismo hipotalámico en humanos^{6,7,71}, y en un desarrollo sexual defectuoso en el ratón^{7,72}.

Por último, la posibilidad de alteraciones en la comunicación glia-neuronal que aceleran la pubertad ha sido sugerida por la presencia de TGF α en astrocitos de dos hamartomas hipotalámicos relacionados con precocidad sexual⁷³.

CONCLUSIONES

El aumento puberal de liberación pulsátil de GnRH está determinado por cambios en la comunicación transináptica, y la activación de las vías de señalización entre glía y neuronas. Las neuronas que emplean aminoácidos estimuladores e inhibidores, y el neuropéptido kisspeptina en la neurotransmisión, son los principales responsables de la regulación transináptica de la pubertad. La glía, por otra parte, facilita la secreción de GnRH por vías de comunicación intercelular, que se inician principalmente por miembros de las familias de factores tróficos EGF y TGF- β . Un aumento coordinado en la transmisión glutamatérgica, acompañado de una disminución del tono inhibitorio GABAérgico, parece poner en marcha la cascada transináptica de eventos que llevan al aumento de liberación de GnRH puberal. A su vez, una vía de comunicación de neurona a glía mediada por aminoácidos estimuladores, sirve para sincronizar la activación simultánea de comunicación transináptica y de glía a neuronas, necesarias para el advenimiento de la madurez sexual. Estas redes celulares parecen funcionar bajo el control de una red de genes de naturaleza jerárquica, similares a aquellas que se postulan que existen en sistemas celulares menos complicados (por ejemplo referencias 74, 75). Mientras que la naturaleza y la organización de esta red aun está por definir, su existencia concuerda con la noción de que el comienzo de la pubertad es un proceso determinado mediante la contribución de varios genes⁷⁶⁻⁷⁸.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boyar R, Finkelstein J, Roffwarg H, Kapen S, Weitzman E, Hellman L. Synchronization of augmented luteinizing hormone secretion with sleep during puberty. *N Engl J Med.* 1972;287:582-6.
2. Ojeda SR, Terasawa E. Neuroendocrine regulation of puberty. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Moss R, Rubin R (eds). *Hormones, Brain and Behavior* (Vol 4). Elsevier, New York. 2002:589-659.
3. Ojeda SR, Skinner MK. Puberty in the rat. In: Neill JD (ed). *The Physiology of Reproduction* (3rd Edition). Academic Press/Elsevier, San Diego. 2006. 2061-126.

4. DeFazio RA, Heger S, Ojeda SR, Moenter SM. Activation of A-type g-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol*. 2002;16:2872-91.
5. Moenter SM, DeFazio RA. Endogenous gamma-aminobutyric acid can excite gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2005;146:5374-9.
6. de Roux N, Genin E, Carel J-C, Matsuda F, Chaussain J-L, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:10972-6.
7. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 2003;349:1614-27.
8. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev*. 2001;22:111-51.
9. Terasawa E. Hypothalamic control of the onset of puberty. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*. 1999;6:44-9.
10. Ojeda SR, Prevot V, Heger S, Lomniczi A, Dziedzic B, Mungenast A 2003 Glia-to neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Ann Med*. 2003;35:244-55.
11. Plant TM. Puberty in primates. In: Knobil E, Neill J (eds). *The Physiology of Reproduction*, 2nd Edition, Vol 2. Raven Press, New York. 1994, 453-485.
12. Ojeda SR, Urbanski HF. Puberty in the rat. In: Knobil E, Neill JD (eds). *The Physiology of Reproduction*, 2nd Edition, Vol 2. Raven Press, New York. 1994. 363-409-
13. Claypool LE, Kasuya E, Saitoh Y, Marzban F, Terasawa E. N-methyl D,L-aspartate induces the release of luteinizing hormone-releasing hormone in the prepubertal and pubertal female rhesus monkey as measured by in vivo push-pull perfusion in the stalk-median eminence. *Endocrinology*. 2000;141:219-28.
14. Plant TM, Gay VL, Marshall GR, Arslan M. Puberty in monkeys is triggered by chemical stimulation of the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:2506-10.
15. Urbanski HF, Ojeda SR. A role for N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the control of LH secretion and initiation of female puberty. *Endocrinology*. 1990;126:1774-6.
16. Bourguignon J-P, Gerard A, Mathieu J, Mathieu A, Franchimont P. Maturation of the hypothalamic control of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion at onset of puberty. I. Increased activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Endocrinology*. 1990;127:873-81.
17. Bourguignon J-P, Gérard A, Alvarez-Gonzalez M-L, Fawe L, Franchimont P. Gonadal-independent developmental changes in activation of N-methyl-D-aspartate receptors involved in gonadotropin-releasing hormone secretion. *Neuroendocrinology*. 1992;55:634-41.
18. Gore AC, Wu TJ, Rosenberg JJ, Roberts JL. Gonadotropin-releasing hormone and NMDA receptor gene expression and colocalization change during puberty in female rats. *J Neurosci*. 1996;16:5281-9.
19. Ottem EN, Godwin JG, Petersen SL. Glutamatergic signaling through the N-methyl-D-aspartate receptor directly activates medial subpopulations of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons, but does not appear to mediate the effects of estradiol on LHRH gene expression. *Endocrinology*. 2002;143:4837-45.
20. Price MT, Olney JW, Cicero TJ. Acute elevations of serum luteinizing hormone induced by kainic acid, N-methyl aspartic acid or homocystic acid. *Neuroendocrinology*. 1978;26:352-8.
21. Donoso AO, López FJ, Negro-Vilar A. Glutamate receptors of the non-N-methyl-D-aspartic acid type mediate the increase in luteinizing hormone releasing hormone release by excitatory amino acid in vitro. *Endocrinology*. 1990;126:414-20.
22. Eyigor O, Jennes L. Expression of glutamate receptor subunit mRNAs in gonadotropin-releasing hormone neurons during the sexual maturation of the female rat. *Neuroendocrinology*. 1997;66:122-9.
23. Eyigor O, Jennes L. Kainate receptor subunit-positive gonadotropin-releasing hormone neurons express c-Fos during the steroid-induced luteinizing hormone surge in the female rat. *Endocrinology*. 2000;141:779-86.
24. Seeburg PH. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci*. 1993;16:359-65.
25. Bourguignon J-P, Gerard A, Alvarez Gonzalez M-L, Purnelle G, Franchimont P. Endogenous glutamate involvement in pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone: Evidence from effect of glutamine and developmental changes. *Endocrinology*. 1995;136:911-6.
26. Shimshek DR, Bus T, Grinevich V, Single FN, Mack V, Sprengel R, Spergel DJ, Seeburg PH. Impaired reproductive behavior by lack of GluR-B containing AMPA receptors but not of NMDA receptors in hypothalamic and septal neurons. *Mol Endocrinol*. 2006;20:219-31.
27. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology*. 2004;145:4565-74.
28. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: A potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:2129-34.
29. Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, Gaytan F, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Tena-Sempere M. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol*. 2004;561:379-86.
30. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, Vazquez MJ, Vigo E, Casanueva FF, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Tena-Sempere M. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*. 2005;146:3917-25.
31. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci*. 2005;25:11349-56.
32. Jarry H, Perschl A, Wuttke W. Further evidence that preoptic anterior hypothalamic GABAergic neurons are part of the GnRH pulse and surge generator. *Acta Endocrinol*. 1988;118:573-9.
33. Akema T, Kimura F. Modulation of pulsatile LH secretion by baclofen, a selective GABAB receptor agonist, in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*. 1992;56:141-7.
34. Wilkinson M, Bhanot R. A puberty-related attenuation of opiate peptide-induced inhibition of LH secretion. *Endocrinology*. 1982;110:1046-8.
35. Blank MS, Mann DR. Diurnal influences on serum luteinizing hormone responses to opiate receptor blockade with naloxone or to luteinizing hormone-releasing hormone in the immature female rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1981;168:338-43.
36. van den Pol AN, Gao X-B, Patrylo PR, Ghosh PK, Obrietan K. Glutamate inhibits GABA excitatory activity in developing neurons. *J Neurosci*. 1998;18:10749-61-

37. Min M-Y, Melyan Z, Kullmann DM. Synaptically released glutamate reduces g-aminobutyric acid (GABA)ergic inhibition in the hippocampus via kainate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:9932-7.
38. Rodriguez-Moreno A, Herreras O, Lerma J. Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron*. 1997;19:893-901.
39. Rodriguez-Moreno A, Lerma J. Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron*. 1998;20:1211-8.
40. Satake S, Saitow F, Yamada J, Konishi S 2000 Synaptic activation of AMPA receptors inhibits GABA release from cerebellar interneurons. *Nat Neurosci*. 2000;3:551-8.
41. Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y 1991 GABA: An excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* 1991;14:515-9.
42. Obrietan K, van den Pol AN 1995 GABA neurotransmission in the hypothalamus: Developmental reversal from Ca²⁺ elevating to depressing. *J Neurosci*. 1995;15:5065-77.
43. Chen G, Trombley PQ, van den Pol AN. GABA receptors precede glutamate receptors in hypothalamic development: Differential regulation by astrocytes. *J Neurophysiol*. 1995;74:1473-83.
44. Insel TR, Miller LP, Gelhard RE. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain—I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*. 1990;35:31-43.
45. Heger S, Seney M, Bless E, Schwarting GA, Bilger M, Mungenast A, Ojeda SR, Tobet SA. Overexpression of glutamic acid decarboxylase-67 (GAD-67) in GnRH neurons disrupts migratory fate and female reproductive function in mice. *Endocrinology*. 2003;144:2566-79.
46. Han SK, Abraham IM, Herbison AE. Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. *Endocrinology*. 2002;143:1459-66.
47. Han SK, Todman MG, Herbison AE. Endogenous GABA release inhibits the firing of adult gonadotropin-releasing neurons. *Endocrinology*. 2004;145:495-9.
48. Dziejic B, Prevot V, Lomniczi A, Jung H, Cornea A, Ojeda SR. Neuron-to-glia signaling mediated by excitatory amino acid receptors regulates erbB receptor function in astroglial cells of the neuroendocrine brain. *J Neurosci*. 2003;23:915-26.
49. Lomniczi A, Cornea A, Costa ME, Ojeda SR. Hypothalamic tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) mediates excitatory amino acid-dependent neuron-to-glia signaling in the neuroendocrine brain. *J Neurosci*. 2006;26:51-62.
50. Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci*. 1998;1:683-92.
51. Fraser DD, Mudrick-Donnon LA, MacVicer BA. Astrocytic GABA receptors. *Glia*. 1994;11:83-93.
52. Verkhratsky A, Steinhauser C. Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev*. 2000;32:380-412.
53. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, Matagne V, Mungenast AE 2006 Minireview: The neuroendocrine regulation of puberty: Is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* 147:1166-1174
54. Roth CL, Mastronardi C, Mungenast A, Heger S, Jung H, Ojeda SR 2004 Gene expression profiling of the nonhuman primate hypothalamus at the time of female puberty reveals activation of tumor suppressor gene expression. *Horm Res* 62(Suppl 2):PL-69 Basic
55. Mungenast AE, Parent A, Chen SS, Goodlett D, Aebersold R, Corfas G, Ojeda SR 2003 The synaptic adhesion molecule SynCAM is associated with ERBB4 dysregulation in the hypothalamus of mice with a delayed onset of puberty. Program No 281 20, 2003 Abstract Viewer Washington, DC: Society for Neuroscience, 2003 Online
56. Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M, Isomura M, Onizuka M, Kitamura T, Sekiya T, Reeves RH, Murakami Y 2001 TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 27:427-430
57. Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Südhof TC 2002 SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297:1525-1531
58. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M 2001 Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411:613-617
59. Steeg PS, Ouatas T, Halverson D, Palmieri D, Salerno M 2003 Metastasis suppressor genes: Basic biology and potential clinical use. *Clin Breast Cancer* 4:51-62
60. Ojeda SR, Hill J, Hill DF, Costa ME, Tapia V, Cornea A, Ma YJ 1999 The Oct-2 POU-domain gene in the neuroendocrine brain: A transcriptional regulator of mammalian puberty. *Endocrinology* 140:3774-3789
61. Mastronardi C, Smiley G, Kuswakabe T, Kawagushi A, Cabrera R, Mungenast A, Kimura S, Ojeda SR 2004 Neuronal deletion of the T/EBP gene delays female puberty and causes premature reproductive senescence. Program No 143 2, 2004 Abstract Viewer Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004 Online
62. Ojeda SR, Lomniczi A, Mungenast A, Mastronardi C, Parent AS, Roth C, Prevot V, Heger S, Jung H 2005 Towards understanding the neurobiology of mammalian puberty: Genetic, genomic and proteomic approaches. In: Kordon C, Gaillard R, Christen Y (eds). *Hormones and the Brain*. Springer Verlag, Berlin:47-60
63. Heger S, Mastronardi C, Lomniczi A, Cabrera R, Roth C, Sippell WG, Jung H, Dissen GA, Ojeda SR 2005 Role of a novel gene (Enhanced at Puberty, EAP-1) in the regulation of female puberty. *Horm Res* 64(Suppl 1):22
64. Treacy MN, Rosenfeld MG 1992 Expression of a family of POU-domain protein regulatory genes during development of the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 15:139-165
65. Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ 1996 The T/ebp null mouse: Thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* 10:60-69
66. Rampazzo A, Pivotto F, Occhi G, Tiso N, Bortoluzzi S, Rowen L, Hood L, Nava A, Danieli GA 2000 Characterization of C14orf4, a novel intronless human gene containing a polyglutamine repeat, mapped to the ARVD1 critical region. *Biochem Biophys Res Commun* 278:766-774
67. Bourguignon J-P, Jaeken J, Gerard A, de Zegher F 1997 Amino acid neurotransmission and initiation of puberty: Evidence from nonketotic hyperglycinemia in a female infant and gonadotropin-releasing hormone secretion by rat hypothalamic explants. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1899-1903
68. Teles MG, Bianco SC, Brito VN, Trarbach E, Seminara SB, Arnold JJP, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC 2006 Activating mutations in GPR54 gene cause gonadotropin-independent precocious puberty. *Prog 88th Ann Mtg Endocrine Soc* (in press):
69. Nicholls RD 2000 The impact of genomic imprinting for neurobehavioral and developmental disorders. *J Clin Invest* 105:413-418

70. Knoll JHM, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM, Jr., Lalonde M, Latt SA 1989 Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* 32:285-290
71. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, O'Rahilly S, Aparicio SA 2005 Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1849-1855
72. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL 2003 The Kiss-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1357-1363
73. Jung H, Carmel P, Schwartz MS, Witkin JW, Bentele KHP, Westphal M, Piatt JH, Costa ME, Cornea A, Ma YJ, Ojeda SR 1999 Some hypothalamic hamartomas contain transforming growth factor alpha, a puberty-inducing growth factor, but not luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4695-4701
74. Basso K, Margolin AA, Stolovitzky G, Klein U, Dalla-Favera R, Califano A 2005 Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. *Nat Genet* 37:382-390
75. Davidson EH, Rast JP, Oliveri P, Ransick A, Calestani C, Yuh C-H, Minokawa T, Amore G, Hinman V, Arenas-mena C, Otim O, Brown CT, Livi CB, Lee PY, Revilla R, Rust AG, Pan ZJ, Schilstra MJ, Clarke PJC, Arnone MI, Rowen L, Cameron RA, McClay DR, Hood L, Bolouri H 2002 A genomic regulatory network for development. *Science* 295:1669-1678
76. Krewson TD, Supelak PJ, Hill AE, Singer JB, Lander ES, Nadeau JH, Palmert MR 2004 Chromosomes 6 and 13 harbor genes that regulate pubertal timing in mouse chromosome substitution strains. *Endocrinology* 145:4447-4451
77. Seminara SB, Crowley WF, Jr. 2001 Perspective: the importance of genetic defects in humans in elucidating the complexities of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology* 142:2173-2177
78. Eaves L, Silberg J, Foley D, Bulik C, Maes H, Erkanli A, Angold A, Costello EJ, Worthman C 2004 Genetic and environmental influences on the relative timing of pubertal change. *Twin Res* 7:471-481.