

AROMATASA EN PECES TELEÓSTEOS

Mercedes Blázquez,* Francesc Piferrer

Departament de Recursos Marins Renovables. Institut de Ciències del Mar (CSIC).
Passeig marítim, 37-49. 08003 Barcelona. Tel. 932 309 542. Fax 932 309 555. Correo electrónico: blazquez@icm.csic.es.

Resum

L'aromatasa és un enzim esteroïdogenètic encarregat de la conversió d'andrògens en estrògens i implicat en el procés de diferenciació sexual dels vertebrats. Els principals llocs de síntesi d'aquest enzim són les gònades i el cervell. A diferència d'altres vertebrats, els peixos teleostis tenen uns nivells extremadament elevats d'aromatasa en el cervell i, per tant, sintetitzen grans quantitats de neuroestrògens, cosa que fa que siguin un model únic per a l'estudi del significat biològic de l'aromatització al sistema nerviós central. Per altra banda, els teleostis són els únics vertebrats que tenen dos gens diferents d'aromatasa, un dels quals s'expressa principalment en el cervell i l'altre en la gònada, i això té com a conseqüència dues proteïnes estructuralment i funcionalment diferents.

Paraules clau Aromatasa, neurogènesi, diferenciació sexual, maduració sexual, llobarro.

Abstract

Aromatase is the steroidogenic enzyme responsible for the conversion of androgens into estrogens and thus it has been implicated in vertebrate sex differentiation. The main sites of synthesis of this enzyme are the gonads and the brain. Contrary to what has been described in other vertebrates, fish are characterized by exceptionally high levels of aromatase activity per unit of protein in the brain and have the ability to synthesize important amounts of estrogens termed neuroestrogens. In addition, teleosts are unique in the animal kingdom since a duplication of their genomes resulted in two genes, one preferably expressed in the gonads and the other one in the brain, responsible for the synthesis of two structural and functionally different proteins.

Key words Aromatase, neurogenesis, sex differentiation, sex maturation, sea bass.

INTRODUCCIÓN

El citocromo P450 aromatasa es el encargado del proceso de aromatización y de andrógenos y pertenece a la superfamilia de citocromos P450 de la que existen más de cuatrocientos ochenta miembros distribuidos a lo largo de setenta y cuatro familias. Se trata de un complejo enzimático que se encuentra anclado a la membrana del retículo endoplásmico liso de varios tipos de células esteroïdogenéticas. El complejo catalíticamente activo está formado por el citocromo P450 aromatasa, encargado de la unión al sustrato, acoplado al citocromo P450 reductasa, a su vez unido a una flavoproteína, la adenina dinucleótido fosfato (NADPH), que facilita el flujo de electrones necesario para la oxidación del sustrato. Este complejo enzimático cataliza la conversión de andrógenos en estrógenos a través de una reacción de aromatización (Conley y Walters,

1999). La aromatización implica varias hidroxilaciones en el grupo metilo del carbono 19. Concretamente, para la síntesis de un mol de estrógeno se necesita la transferencia de tres pares de electrones con el consiguiente consumo de tres moles de oxígeno molecular y tres de NADPH.

GENES Y LUGARES DE EXPRESIÓN

El gen que codifica a la aromatasa es el *cyp19* y en el caso de la gran mayoría de los tetrápodos, exceptuando el cerdo (Choi *et al.*, 1997), solo existe una copia de este gen en su genoma haploide de forma que su expresión diferencial en diferentes tejidos se consigue por mecanismos de *splicing* alternativo o de utilización de diferentes zonas del promotor. Sin embargo, en el caso de los teleosteos se postula la

hipótesis de que en un pez ancestral se produjo una duplicación cromosómica, de modo que existen dos genes diferentes denominados *cyp19a* y *cyp19b* que codifican la síntesis de dos proteínas estructuralmente distintas P450aromA y P450aromB que se expresan preferentemente en gónadas y en cerebro, respectivamente (Force *et al.*, 1999). En la mayoría de los vertebrados estudiados, se ha visto que la expresión de aromatasa tiene lugar principalmente en cerebro y gónadas, aunque también se ha encontrado expresión en una gran variedad de tejidos entre los que cabe destacar la placenta, el riñón, el hígado, tejido adiposo, tejido óseo y el tracto digestivo (Simpson *et al.*, 2002).

ESTRUCTURA MOLECULAR Y FILOGENIA

Estudios basados en la estructura molecular de la aromatasa han revelado la presencia de varios dominios funcionales (Amarneh *et al.*, 1993) filogenéticamente conservados, lo que confirma su importancia durante la evolución. Estos dominios son la hélice-1, que interviene en la activación del oxígeno molecular, el péptido de ozol, implicado en la unión del esteroide, la región específica de la aromatasa y la zona de unión del grupo hemo que interviene en la aromatización del anillo A de los esteroides (véase la figura 1).

Estudios filogenéticos demuestran que las dos isoformas de aromatasa presentes en gónadas y cerebro de teleósteos son ortólogas de la aromatasa de los tetrápodos y miembros de clados parálogos en la línea evolutiva de los peces (véase la figura 2). Además, el hecho de que el porcentaje de identidad entre la forma de gónada y de cerebro en una misma especie sea bajo indica que ambos genes se separaron posiblemente después de la aparición de los teleósteos.

AROMATASA Y NEUROGÉNESIS

Datos recientes indican que los estrógenos producidos de forma local en el cerebro por aromatización de andrógenos son importantes en procesos de neurogénesis (García-segura *et al.*, 2001). En efecto, durante etapas tempranas del desarrollo los esteroides sexuales de origen cerebral, particularmente los estrógenos (neuroestrógenos), tienen una importancia singular en el crecimiento del cerebro y la configuración de las áreas que controlarán la reproducción cuando el animal alcance la madurez sexual (Hutchison *et al.*, 1999). El efecto organizador que los esteroides sexuales ejercen sobre las estructuras cerebrales en un cerebro en pleno crecimiento y desarrollo se conoce como *diferenciación sexual del cerebro*. Los estrógenos actúan sobre

las neuronas, sus sinapsis y las células de la glía, regulando su supervivencia y diferenciación (McEwen, 2001). Posteriormente, actuarán sobre las mismas estructuras (efecto activador) y serán responsables de funciones biológicamente relevantes como la reproducción. La síntesis de neuroestrógenos implica la presencia de aromatasa en el cerebro. En este sentido, y al contrario de lo que ocurre en mamíferos, los peces teleósteos se caracterizan por exhibir niveles muy elevados de actividad aromatasa en el cerebro, llegando a ser incluso cien y hasta mil veces superiores por unidad de proteína a los encontrados en mamíferos (Callard *et al.*, 1990), lo que convierte a los peces en un excelente modelo de estudio. El significado biológico de estos elevados niveles de actividad aromatasa y, por tanto, de la elevada producción de neuroestrógenos en teleósteos es todavía una cuestión sin resolver aunque la hipótesis de la neurogénesis es la más apoyada. Contrariamente a lo que ocurre en mamíferos, la neurogénesis en peces tiene lugar durante toda la vida de los individuos, debido a la elevada plasticidad y el gran poder regenerativo de los peces adultos (Clint y Zupanc, 2001) y parece estar asociada con elevados niveles de aromatasa y neuroestrógenos (Menuet *et al.*, 2003).

La aromatasa de cerebro ha estado siempre asociada al denominado *cerebro reproductivo*, que es el cerebro anterior y que comprende fundamentalmente el bulbo olfatorio, el telencéfalo y el hipotálamo. Recientemente, se ha demostrado la presencia de mRNA de aromatasa en células de la glía en varias especies de teleósteos (Forlano *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2003), mientras que en mamíferos y aves la expresión de aromatasa está restringida a las neuronas (Balzathart y Ball, 1998). Estas células de la glía están implicadas en la migración de las neuronas durante la neurogénesis. De hecho, en mamíferos se ha visto que en situaciones posteriores al daño cerebral, los niveles de aromatasa y, por tanto, los de neuroestrógenos, se encuentran muy elevados, lo que relaciona a esta enzima en procesos de neuroprotección y de neurogénesis o regeneración neuronal (Azcoitia *et al.*, 2001). Esta neurogénesis debe tener también importancia en la reorganización del cerebro no solo ante un daño neuronal sino también ante eventos biológicamente fundamentales para los individuos durante los que se requieren reestructuraciones de núcleos o áreas cerebrales. Eventos de este tipo son, por ejemplo, la diferenciación sexual o la reproducción, en los cuales el cerebro y los esteroides sexuales formados localmente son parte activa.

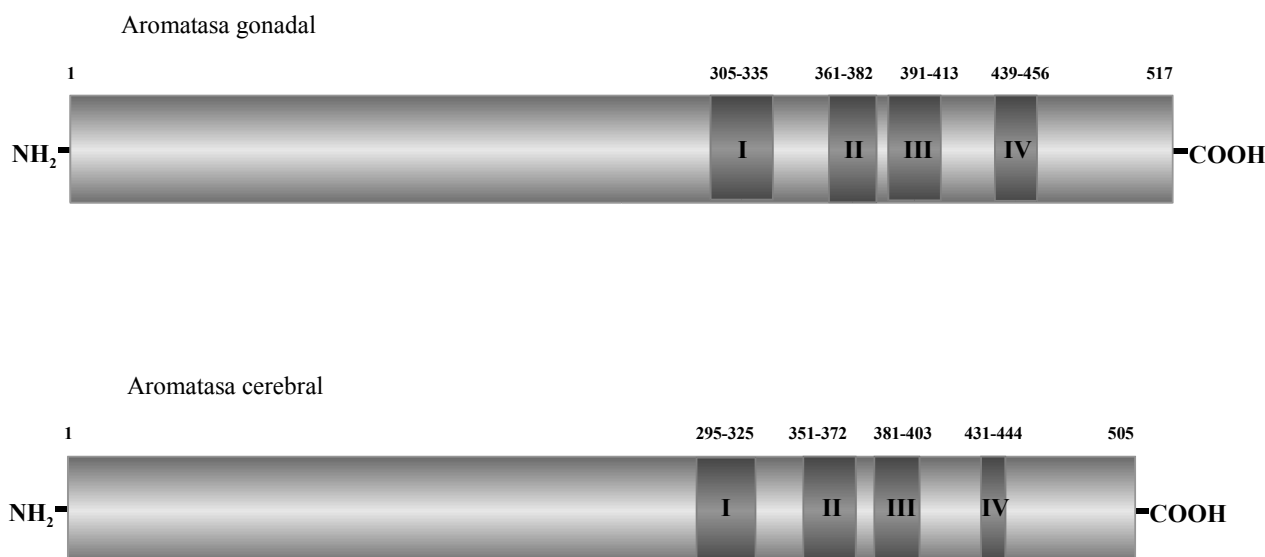


Figura 1 Representación esquemática de las dos isoformas de la aromatasa en la lubina, una específica de ovario y la otra de cerebro. Como en todos los teleósteos estudiados, la aromatasa gonadal es algo más larga que la del cerebro. Sin embargo, todas ellas, desde mamíferos hasta peces, poseen los mismos dominios funcionales y están estructuradas del mismo modo. I: hélice-I, II: péptido de ozol, III: región específica de la aromatasa, IV: zona de unión del grupo hemo. Los números corresponden a los aminoácidos.

AROMATASA Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL

La mayoría de los estudios sobre la expresión de la aromatasa durante la diferenciación sexual se han centrado en la gónada. Básicamente, los estudios refuerzan la idea de que niveles elevados de aromatasa son esenciales para la síntesis de estradiol y por lo tanto para la diferenciación ovárica. De hecho, la aromatasa gonadal juega un papel clave en el proceso de diferenciación sexual, dado que es la responsable final de la síntesis de estradiol en las gónadas (Devlin y Nagahama, 2002). Recientemente se ha demostrado en la tilapia que los niveles de aromatasa en las hembras son muy elevados, mientras que en los machos se observa el efecto contrario. Esto reafirma la idea de que la aromatasa es fundamental para el desarrollo ovárico y no para el testicular, implicando a esta enzima en la diferenciación sexual de peces teleósteos (Kwon *et al.*, 2001). Sin embargo, en el caso de la aromatasa cerebral no parece que su papel sea tan evidente. Los altos niveles de actividad y expresión aromatasa presentes en el cerebro de peces teleósteos están al mismo tiempo regulados por los niveles de estradiol (Kishida y Callard, 2001). También se han localizado elementos de respuesta a los estrógenos (EREs) en el promotor de la aromatasa de cerebro de varias especies de teleósteos (Tchoudakova *et al.*, 2001), lo cual implica directamente a los estrógenos en el control de la expresión de la aromatasa cerebral por activación directa de los ERE.

AROMATASA Y MADURACIÓN SEXUAL

En vertebrados, los estrógenos poseen efectos endocrinos, paracrinos y autocrinos en muchos procesos biológicos fundamentales, entre los que cabe destacar el comportamiento sexual, la maduración sexual y la gonadogénesis. En el caso de la aromatasa gonadal, ésta se ha asociado tradicionalmente al desarrollo ovárico, debido a su papel fundamental en la producción de estrógenos. Sin embargo, la concepción de que el estradiol es la hormona femenina por excelencia se ha abandonado, dado que los niveles de esta hormona en machos son considerables. En este aspecto, se ha visto que la aromatasa es fundamental para el desarrollo de la espermatogénesis en mamíferos, lo cual se ha demostrado usando ratones para los que el gen de la aromatasa se había inactivado (*knock out*). La importancia de la aromatasa también se ha demostrado en un pez evolutivamente ancestral como es el caso del tiburón, donde la esteroidogénesis tiene lugar en las células de Sertoli, siendo los niveles de aromatasa, y por tanto de estradiol, elevados durante estadios tempranos de la espermiogénesis, mientras que la testosterona es necesaria en estadios más tardíos como son la maduración de las espermátidas y la producción de esperma (Callard *et al.*, 1985). También en el caso del ovario, la producción de estradiol durante el ciclo reproductor está determinada por cambios en la actividad y la expresión del gen de la aromatasa. En este sentido, se ha observado un aumento de la producción

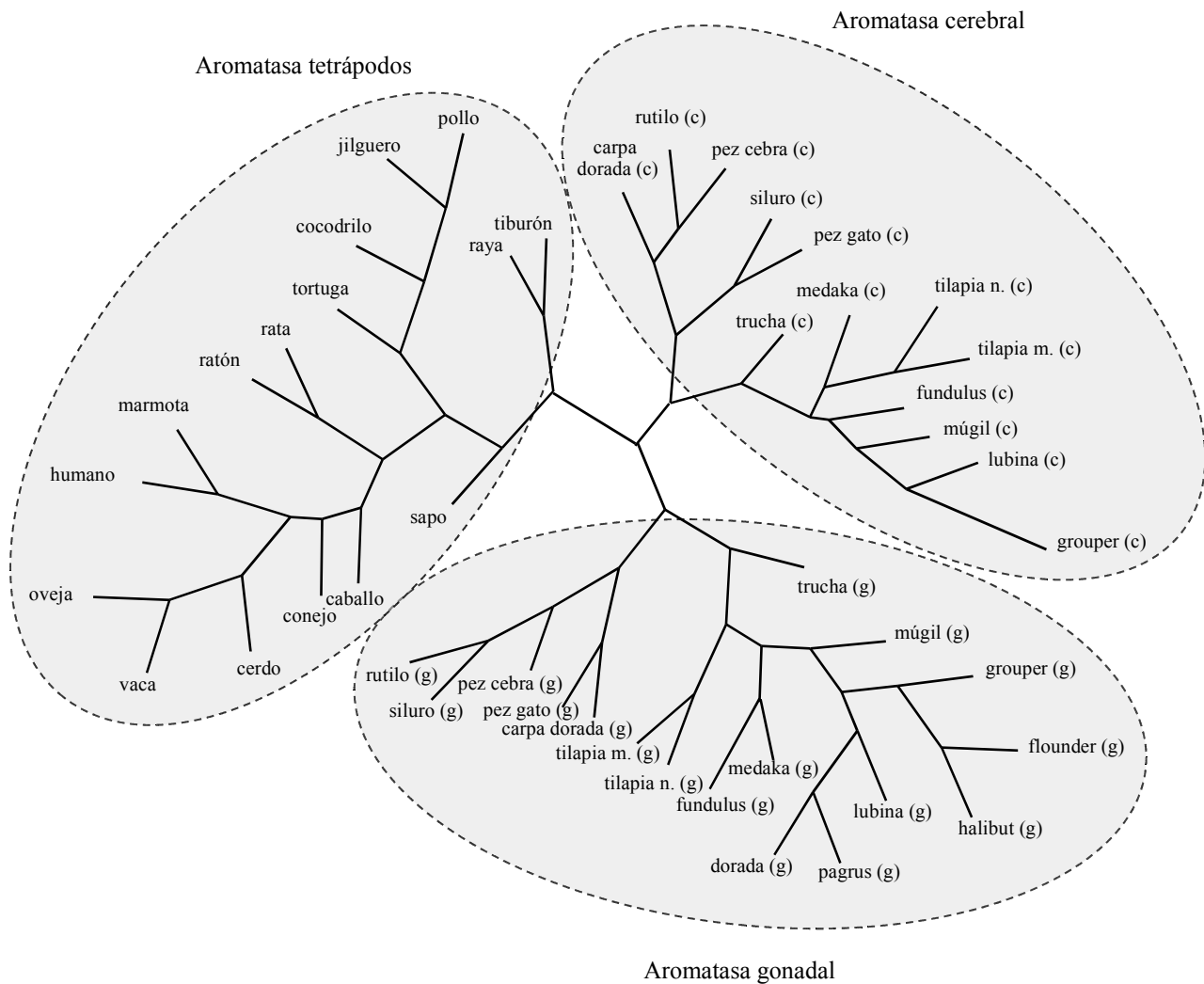


Figura 2 Árbol filogenético de las proteínas aromatasa a lo largo de la evolución de los vertebrados. Las distancias evolutivas se han calculado con el método empírico de Kimura y el árbol se ha construido usando el método de *neighbour joining*. g) isoforma gonadal, c) isoforma cerebral, tilapia m. = tilapia de Mozambique, tilapia n. = tilapia del Nilo. Se observan tres agrupaciones claras, la de las aromatasa de tetrápodos (una única forma) y en el caso de los peces teleósteos la de las aromatasa cerebrales y las aromatasa gonadales.

de estradiol durante la vitelogénesis en varias especies de teleósteos como la trucha, la tilapia, la medaka o la dorada. Además, la disminución de los niveles de estradiol al final de la vitelogénesis y al inicio del proceso de maduración de los oocitos coincide con la disminución de la actividad y la expresión de la aromatasa (Chang *et al.*, 1997). Trabajos recientes en la trucha han demostrado que en el caso de los peces, al igual que ocurre en mamíferos, la estimulación de la producción de estradiol por parte de la hormona foliculo estimulante (FSH) está mediada por una estimulación de la expresión y la actividad de la enzima aromatasa (Montserrat *et al.*, 2004).

LA AROMATASA EN LA LUBINA

La lubina europea, *Dicentrarchus labrax*, es una especie importante tanto en investigación básica como aplicada. Estudios recientes indican la existencia de dos actividades catalíticas para la aromatasa, una propia de cerebro y la otra de ovario (González y Piferrer, 2002). Otros estudios han determinado la secuencia de dos proteínas diferentes, una expresada principalmente en gónadas (Dalla Valle *et al.*, 2002) y otra en cerebro (Blázquez y Piferrer, 2004). Además, se han demostrado diferencias entre machos y hembras en los niveles de actividad aromatasa en diferentes partes del cerebro durante el ciclo reproductor (González y Piferrer, 2003). Incluso se ha determinado la presencia

de niveles elevados de aromatasa cerebral durante los primeros estadios del desarrollo (Blázquez y Piferrer, datos no publicados) y también durante el proceso de diferenciación sexual (Blázquez y Piferrer, 2004). Estos estudios sugieren que los altos niveles encontrados durante los primeros estadios del desarrollo, que coinciden con un rápido crecimiento del cerebro, serían el reflejo de un proceso de neurogénesis activa, mientras que los niveles elevados en el momento de la diferenciación sexual, siendo estos superiores en hembras que en machos, estarían relacionados con el proceso de diferenciación sexual en esta especie.

PERSPECTIVAS FUTURAS

El estudio de la función de la aromatasa y, por tanto, de los neuroestrógenos en los peces teleósteos, se perfila como una importante línea de investigación en el caso de la neurogénesis. La expresión de aromatasa en células de la glía en teleósteos, así como los elevados niveles de esta enzima en el cerebro de estos peces hace de ellos un material interesante de estudio. Del mismo modo, la gran cantidad de neuroestrógenos producidos por los teleósteos, conocidos por su función neurotrófica, y el hecho de que la aromatasa se encuentre en células de la glía, relacionadas sobre todo con la migración y la regeneración neuronal, evidencia que en estos peces los estrógenos podrían tener funciones diferentes a las meramente reproductivas. El significado biológico y funcional de la aromatasa en el cerebro de los peces es algo que aún queda por dilucidar.

BIBLIOGRAFÍA

- AMARNEH, B.; CORBIN, C. J.; PETERSON, J. A.; SIMPSON, E. R.; GRAHAM-LORENCE, S. (1993). «Functional domains of human aromatase cytochrome P450 characterized by linear alignment and site-directed mutagenesis». *Mol. Endocrinol.*, 7:1617-1624.
- AZCOITIA, I.; SIERRA, A.; VEIGA, S.; HONDA, S. I.; HARADA, N.; GARCÍA-SEGURA, L. M. (2001). «Brain aromatase is neuroprotective». *J. Neurobiol.*, 47:318-329.
- BALZATHART, J.; BALL, G. F. (1998). «New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase)». *Trends Neurosci.*, 21:243-249.
- BLÁZQUEZ, M.; PIFERRER, F. (2003). «Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*)». *Mol. Cell. Endocrinol.*, 219:83-94.
- CALLARD, G. V.; PUDNEY, J. A.; MAK, P.; CANICK, J. A. (1985). «Stage-dependent changes in steroidogenic enzymes and estrogen receptors during spermatogenesis in the testis of the dogfish, *Squalus acanthias*». *Endocrinology*, 117:1328-1335.
- CALLARD, G. V.; SCHLINGER, B. A.; PASMANIK, M. (1990). «Nonmammalian vertebrate models in studies of brain-steroid interactions». *J. Exp. Zool. (Suppl.)*, 4:6-16.
- CHANG, X. T.; KOBAYASHI, T.; KAJIURA, H.; NAKAMURA; NAGAHAMA, Y. (1997). «Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis». *J. Mol. Endocrinol.*, 18:57-66.
- CHOI, I.; TROYER, D. L.; CORNWELL, D. L.; KIRBY-DOBBELS, K. R.; COLLANTE, W. R.; SIMMEN, F. A. (1997). «Closely related genes encode developmental and tissue isoforms of porcine cytochrome P450 aromatase». *DNA Cell Biol.*, 16:769-777.
- CLINT, S.; ZUPANC, G. (2001). «Neuronal regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*: guidance of migrating young cells by radial glia». *Dev. Brain. Res.*, 130:15-23.
- CONLEY, A. J.; WALTERS, K. W. (1999). «Aromatization». Dins: *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 1:280-291. Academic Press.
- DALLA VALLE, L.; LUNARDI, L.; COLOMBO, L.; BELVEDERE, P. (2002). «European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cytochrome P450arom: cDNA cloning, expression and genomic organization». *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 80:25-34.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. (2002). «Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences». *Aquaculture*, 208:191-364.
- FORCE, A.; LYNCH, M.; PICKETT, F. B.; AMORES, A.; YAN, Y. L.; POSTLETHWAIT, J. (1999). «Preservation of duplicate genes by complementary degenerative mutations». *Genetics*, 151:1531-1545.
- FORLANO, P. M.; DEITCHER, D. L.; MYERS, D. A.; BASS, A. H. (2001). «Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source». *J. Neurosci.*, 21:8943-8955.
- GARCIA-SEGURA, L. M.; AZCOITIA, I.; DONCARLOS, L. L. (2001). «Neuroprotection by estradiol». *Prog. Neurobiol.*, 63:29-60.
- GONZÁLEZ, A.; PIFERRER, F. (2002). «Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes». *J. Exp. Zool.*, 293:500-510.
- (2003). «Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle». *Gen. Comp. Endocrinol.*, 132:223-230.
- HUTCHINSON, J. B.; WOZNIAK, A.; BEYER, C.; KAROLCZAK, M.; HUTCHINSON, R. E. (1999). «Steroid metabolising enzymes in the determination of brain gender». *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 69:85-96.

- KISHIDA, M.; CALLARD, G. V. (2001). «Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development». *Endocrinology*, 142:740-750.
- KWON, J. Y.; MCANDREW, B. J.; PENMAN, D. J. (2001). «Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)». *Mol. Reprod. Dev.*, 59:359-370.
- MCEWEN, B. S. (2001). «Estrogen effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms». *J. Appl. Physiol.*, 91:2785-2801.
- MENUET, A.; ANGLADE, I.; LE GUEVEL, R.; PELLEGRINI, E.; PAKDEL, F.; KAH, O. (2003). «Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha». *J. Comp. Neurol.*, 462:180-93.
- MONTERRAT, N.; GONZÁLEZ, A.; MÉNDEZ, E.; PIFERRER, F.; PLANAS, J. V. (2004). «Effects of follicle stimulating hormona on estradiol-17beta production and P-450 aromatase (CYP19) activity and mRNA expression in brown trout vitellogenic ovarian follicles *in vitro*». *Gen. Com. Endocrinol.*, 137:123-131.
- SIMPSON, E. R.; CLYNE, C.; RUBIN, G.; BOON, W. C.; ROBERTSON, K.; BRITT, K.; SPEED, C.; JONES, M. (2002). «Aromatase- A brief overview». *Ann. Rev. Physiol.*, 64:93-127.
- TCHOUDAKOVA, A.; KISHIDA, M.; WOOD, E.; CALLARD, G. V. (2001). «Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish». *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 78:427-39.