

Testosterona inhibe la actividad de la aldosterona sintasa silvestre y quimérica *in vitro*

ANDREA VECCHIOLA^{1,2,3,a}, CRISTÓBAL A. FUENTES^{1,2,3,a},
CRISTIAN A. CARVAJAL^{1,2,3,a}, CARMEN CAMPINO^{1,2,3},
FIDEL ALLENDE^{3,4}, ALEJANDRA TAPIA-CASTILLO^{1,2,3,a},
CARLOS F. LAGOS^{5,a}, CARLOS E. FARDELLA^{1,2,3}

Testosterone inhibits human wild-type and chimeric aldosterone synthase activity in vitro

Background: *Familial hyperaldosteronism type I is caused by the generation of a chimeric aldosterone synthase enzyme (ASCE) which is regulated by ACTH instead of angiotensin II. We have reported that in vitro, the wild-type (ASWT) and chimeric aldosterone synthase (ASCE) enzymes are inhibited by progesterone and estradiol does not affect their activity. Aim: To explore the direct action of testosterone on ASWT and ASCE enzymes. Material and Methods: HEK-293 cells were transiently transfected with vectors containing the full ASWT or ASCE cDNAs. The effect of testosterone on AS enzyme activities was evaluated incubating HEK-cells transfected with enzyme vectors and adding deoxycorticosterone (DOC) alone or DOC plus increasing doses of testosterone. Aldosterone production was measured by HPLC-MS/MS. Docking of testosterone within the active sites of both enzymes was performed by modelling in silico. Results: In this system, testosterone inhibited ASWT (90% inhibition at five μM , 50% inhibitory concentration (IC50) = 1.690 μM) with higher efficacy and potency than ASCE (80% inhibition at five μM , IC50 = 3.176 μM). Molecular modelling studies showed different orientation of testosterone in ASWT and ASCE crystal structures. Conclusions: The inhibitory effect of testosterone on ASWT or ASCE enzymes is a novel non-genomic testosterone action, suggesting that further clinical studies are needed to assess the role of testosterone in the screening and diagnosis of primary aldosteronism.*

(Rev Med Chile 2021; 149: 1539-1543)

Key words: Cytochrome P-450 CYP11B2; HEK293 Cells, Testosterone.

El aldosteronismo primario (AP) es una causa conocida de hipertensión. Los individuos con esta condición representan casi 10% de la población hipertensa y la prevalencia del AP aumenta con la gravedad de la enfermedad hipertensiva¹. La alta prevalencia del AP puede detectarse utilizando el índice de actividad de aldosterona sérica/renina plasmática (ARR) para el tamizaje y, la supresión de aldosterona como prueba de confirmación (infusión salina, supresión de fludrocortisona o captopril).

Los subtipos más frecuentes de la enfermedad son el aldosteronismo idiopático y el adenoma productor de aldosterona. Otras causas menos frecuentes de AP son las variantes familiares. Cuatro formas de hiperaldosteronismo familiar han sido descritas (FH-I a FH-IV) junto con el síndrome de aldosteronismo primario, que se presentan con convulsiones y anomalías neurológicas (PASNA)²⁻⁴. El FH-I, también llamado aldosteronismo remediable con glucocorticoides, representa sólo de 0,5 a 1% de la AP⁵.

¹Departamento de Endocrinología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

²Millennium Institute on Immunology and Immunotherapy.

³Centro Traslacional de Endocrinología UC (CETREN).

⁴Departamento de Laboratorios Clínicos, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

⁵Facultad de Medicina y Ciencia, Universidad San Sebastián. Santiago, Chile.

^aPhD.

Trabajo financiado por grants de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT) FONDECYT 1160695, CORFO 13CTI-21526-P1, e Iniciativa Científica Milenio IM11 P09/016- F (ICM) . Centro Traslacional de Endocrinología UC (CETREN).

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Recibido el 13 de noviembre de 2020, aceptado el 3 de agosto de 2021.

Correspondencia a:
Dr. Carlos Fardella
Departamento de Endocrinología
Escuela de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile
Diagonal Paraguay 362, Piso 4,
Santiago, Chile
cfardella@med.puc.cl

Un rasgo distintivo del hiperaldosteronismo familiar tipo I es la presencia de una enzima quimérica, aldosterona sintasa, producida por el entrecruzamiento desigual de los genes que codifican las enzimas 11 β -hidroxilasa (CYP11B1) y aldosterona sintasa (CYP11B2). Estos genes son 95% idénticos en la secuencia de nucleótidos⁵⁻⁸. La enzima 11 β -hidroxilasa (gen CYP11B1) se expresa normalmente en ambas zonas de la corteza suprarrenal: fasciculata y glomerulosa, cataliza la biosíntesis de cortisol y aldosterona, respectivamente. En la zona fasciculata, este gen está regulado por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). La aldosterona sintasa (gen CYP11B2) se expresa típicamente solo en la glomerulosa suprarrenal y su producto cataliza los dos pasos finales de la biosíntesis de aldosterona y está regulado por la angiotensina II. La generación de la enzima quimérica (gen CYP11B1/CYP11B2) da como resultado la expresión ectópica de la aldosterona sintasa en la zona fasciculada que está regulada por ACTH en lugar de angiotensina II, lo que causa hipertensión severa, hiperaldosteronismo variable, actividad de renina plasmática baja y potasio normal o disminuido.

En los últimos años, algunos trabajos han indicado que los esteroides sexuales femeninos pueden modificar los niveles de aldosterona y el índice de actividad de aldosterona sérica/renina plasmática (ARR) utilizado en la detección del aldosteronismo primario (PA). En mujeres en fase lútea, aumentan las concentraciones de aldosterona, lo que podría dar un falso positivo en las pruebas de cribado y confirmación de PA⁹. Además, nuestro estudio previo en una mujer embarazada portadora de hiperaldosteronismo familiar tipo I demostró una mejora en la presión arterial, concomitante con la normalización de la ARR durante el embarazo. Después del parto, la progesterona y el estradiol disminuyeron, la aldosterona aumentó, la actividad de la renina plasmática se suprimió y la ARR fue muy alta¹⁰. Estas observaciones apoyan nuestro estudio *in vitro* informado anteriormente en el que las actividades de la enzima aldosterona sintasa de tipo silvestre y quimérica fueron inhibidas por la progesterona, pero el estradiol no demostró ningún efecto¹¹.

Por otro lado, se dispone de poca información sobre el papel de las hormonas masculinas en la actividad de la aldosterona sintasa, aunque algunos autores han informado que los hombres tienen una

presión arterial más alta que las mujeres¹². Pocos estudios han analizado el efecto de la testosterona en la producción de aldosterona, y la mayoría de estos estudios se realizaron utilizando modelos animales o experimentales. Durante nuestro estudio con un caso índice masculino portador de FH-I y su pedigrí de 4 generaciones¹⁰, observamos que la aldosterona y la ARR disminuyeron con la edad. Con base en esta observación familiar, postulamos que los cambios en las hormonas gonadales masculinas observados durante la transición de la niñez a la edad adulta también podrían alterar los niveles de aldosterona, lo que a su vez podría explicar la normalización de la ARR en la edad adulta.

Anteriormente habíamos evaluado la acción directa de la progesterona y el estradiol sobre las actividades de la aldosterona sintasa quimérica y de tipo silvestre utilizando células HEK-293 transfectadas transitoriamente con aldosterona sintasa de tipo silvestre o enzimas quiméricas CYP11B1/CYP11B2. La producción de aldosterona se determinó utilizando desoxicorticosterona (DOC) como sustrato. En este sistema, demostramos que la progesterona inhibía la aldosterona sintasa de tipo silvestre con una eficacia similar y mayor potencia que la enzima quimérica, mientras que el estradiol no tenía ningún efecto sobre ninguna de las enzimas¹¹. Utilizando estos modelos, en este trabajo, exploramos la acción directa de la testosterona sobre la aldosterona sintasa de tipo silvestre (ASWT) y la aldosterona sintasa quimérica (ASCE).

Métodos

Reactivos y células

Se desarrolló un ensayo *in vitro* que utiliza células HEK-293 transfectadas con un vector que contiene el promotor fuerte de citomegalovirus (PCMV) y ADNc de ASCE o ASWT para la enzima aldosterona sintasa como se describió anteriormente¹¹. En resumen, el gen quimérico CYP11B1/B2 utilizado en este ensayo consistió en una fusión de los exones 1 a 3 de CYP11B1 (1-573 pb) y los exones 4 a 9 de CYP11B2 (574-1512 pb). Las eficiencias de transfección se analizaron contando las células que expresan la proteína verde fluorescente (pZsGreen1-n1, Clontech, California, EE. UU.) utilizada como marcador de eficiencia de transfección como describimos en un estudio anterior¹¹. La eficiencia de transfección fue comparable entre las diferentes construcciones.

Los niveles de expresión de ARNm de ASWT y ASWT en células HEK-293 transfectadas fueron similares a los descritos en un estudio anterior¹¹.

Se evaluó la actividad de ambas enzimas incubando células HEK-293 transfectadas con PCMV-CYP11B1, PCMV-CYP11B1/B2 y PCMV-CYP11B2 con concentraciones crecientes de desoxicorticosterona como sustrato (DOC, Steraloids Inc., Andover, MA, EE. UU.). La producción de aldosterona se cuantificó mediante HPLC-MS/MS (Agilent 1200, ABI Sciex API 4000 Qtrap). Los parámetros cinéticos aparentes obtenidos fueron $K_m = 1,163 \mu\text{M}$ y $V_{max} = 36,98 \mu\text{M}/24 \text{ h}$ para ASWT y $K_m = 1,191 \mu\text{M}$ y $V_{max} = 27,08 \mu\text{M}/24 \text{ h}$ para ASCE [11]. En este sistema, analizamos el efecto de la testosterona entre 0 y 10 μM (Steraloids Inc., Andover, MA, EE. UU.) sobre las enzimas ASWT y ASCE.

Modelado molecular de enzimas quiméricas CYP11B2 y CYP11B1/B2 y acoplamiento de esteroides. Para examinar el modo de unión potencial de la testosterona dentro del sitio activo de las enzimas ASWT y ASCE, primero usamos la estructura cristalina de ASWT humana en un complejo con DOC (PDB id 4DVQ) para generar un modelo ASCE¹³. El modelado comparativo se realizó utilizando el programa MODELLER implementado en el protocolo Build Homology Models en Discovery Studio v2.1 (Accelrys Inc., San Diego, EE. UU.). Se utilizó MarvinSketch (ChemAxon, Budapest, Hungría) para dibujar y generar un modelo 3D de testosterona (<https://chemaxon.com/products/marvin>). El acoplamiento de testosterona dentro de los sitios activos de ambas enzimas se realizó utilizando FRED v3.2.0.2 (OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM), y las soluciones se clasificaron de acuerdo con la función de puntuación ChemGauss 4 (<https://www.eyesopen.com/>) (Software OS. FRED. 2015. <http://www.eyesopen.com>).

Análisis de los datos

Los datos se expresan como media con SEM. Las diferencias entre medias se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas y Tuckey como prueba post hoc. El efecto inhibitorio de la testosterona en la actividad de la aldosterona sintasa silvestre y quimérica se estimó calculando la dosis inhibitoria 50 (IC50). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Prism

v5.03 (GraphPad Software, Inc.) Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0,05$.

Resultados

El efecto de la testosterona (desde 0 a 10 μM) sobre las actividades ASWT y ASCE se evaluó en nuestro bioensayo utilizando como sustrato DOC 1,5 μM (Figura 3, panel A). La testosterona inhibió la aldosterona sintasa de tipo silvestre (ASWT, 90% de inhibición a cinco μM , $IC_{50} = 1,690 \mu\text{M}$) con mayor eficacia y potencia que la enzima quimérica (ASCE, 80% de inhibición a cinco μM , $IC_{50} = 3,176 \mu\text{M}$).

Para explorar el modo de unión putativo de la testosterona en los sitios activos de ambas enzimas, realizamos simulaciones de acoplamiento. En la Figura 1, los paneles B y C muestran los modos de unión pronosticados más favorables obtenidos para la testosterona dentro de los sitios activos ASWT y ASCE. Nuestros resultados indican que la testosterona muestra un modo de unión similar al observado para DOC en la estructura cristalina de ASWT. Sin embargo, dentro del sitio activo de ASCE, la testosterona se une en una orientación inversa con respecto a DOC, con el grupo 17-hidroxi mirando hacia el bolsillo polar pero sin establecer ninguna interacción de enlace de hidrógeno.

Discusión

Nuestros resultados muestran que la testosterona inhibe las actividades de las enzimas aldosterona sintasa de tipo silvestre y quiméricas *in vitro*. La testosterona mostró mayor eficacia para ASWT, con potencia similar pero menor eficacia para ASCE. Estos hallazgos fueron similares a los resultados descritos para la progesterona utilizando el mismo bioensayo¹¹. Sin embargo, la testosterona mostró mayor potencia y similar eficacia a la progesterona para ASWT y mayor potencia y menor eficacia para ASCE.

Los estudios de acoplamiento predijeron que el modo de unión de la testosterona es similar al modo de unión de la progesterona en ASWT. Sin embargo, la testosterona se une en una orientación opuesta a la progesterona dentro del sitio activo de ASCE, con su grupo 17-hidroxi se enfrenta al bolsillo polar y no logra establecer ninguna interacción de enlace de hidrógeno, lo que muestra

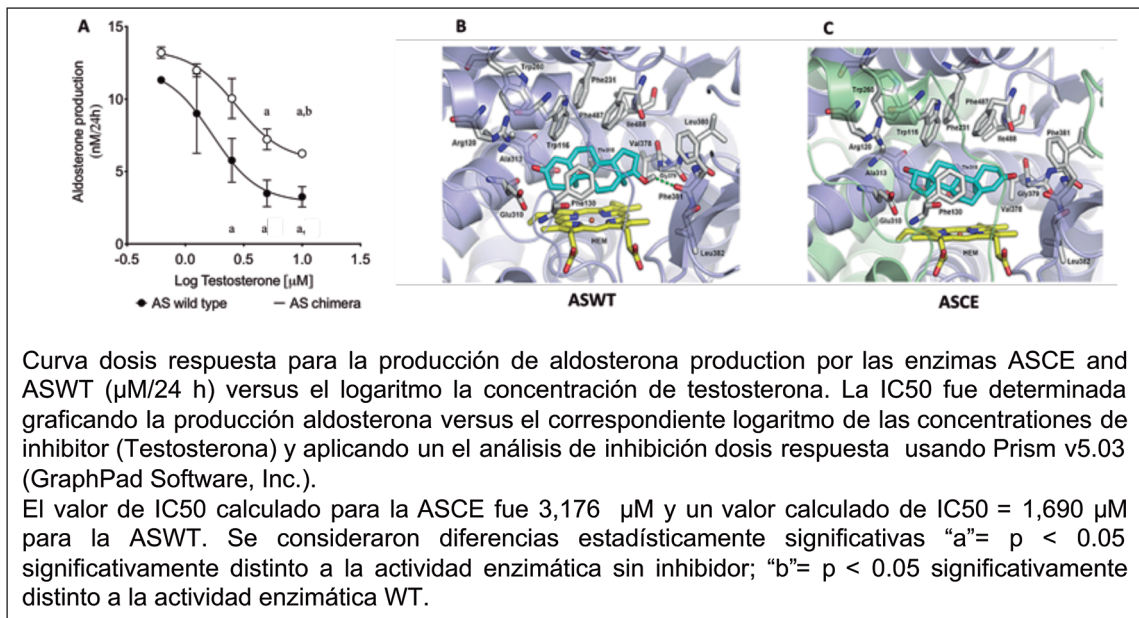


Figura 1. Efectos inhibitorios de la testosterona en la aldosterona sintasa de tipo silvestre (ASWT) y la aldosterona sintasa quimérica (ASCE). **Panel A:** Curva dosis respuesta para la producción de aldosterona (microg/24h) en función del logaritmo de la concentración de testosterona. Enzima ASWT (círculos negros) y ASCE (círculos blancos). La IC50 calculada fue 1,690 microM para la ASWT y 3,176 microM para la ASCE. a: actividad de cada enzima en presencia de testosterona respecto a la actividad enzimática sin inhibidor, $p < 0,05$. b: comparación entre la actividad de la enzima ASWT y ASCE en presencia de testosterona 10 microM, $p < 0,05$. **Panel B:** Modo de unión de testosterona (azul claro) en el sitio activo de la enzima aldosterona sintasa de tipo silvestre. **Panel C:** Modo de unión de testosterona (azul claro) en el sitio activo de la enzima aldosterona sintasa quimérica.

una menor capacidad inhibitoria. Las interacciones restantes fueron muy similares a las publicadas para la progesterona¹¹.

Actualmente, existe información limitada sobre el efecto de la testosterona en la biosíntesis de aldosterona. Aunque algunos estudios han analizado el efecto de esta hormona en la producción de aldosterona, la mayoría se han realizado en modelos animales o experimentales. Se ha comunicado que la testosterona y el andrógeno sintético metilandrostenodiol disminuyen la expresión del ARNm del citocromo P-450 11 β en las mitocondrias suprarrenales de ratas hembra¹⁴. Kau y col. informaron que la concentración plasmática de aldosterona era mayor en ratas orquiectomizadas (Orx) sin reemplazo de testosterona y observaron *in vitro* que la testosterona causaba una marcada disminución en la secreción de aldosterona por las células de la zona glomerulosa¹⁵.

Posteriormente, Ajdžanović et al. comunicaron en ratas Wistar Orx de mediana tratamiento con testosterona producía significativos cambios en las células de la zona glomerulosa consistentes

en aumento de volumen (50% $p < 0,05$) y del número de núcleos (25% $p < 0,05$) respecto con los mismos parámetros en el grupo Orx¹⁶. Además, Hakki et al. usó la cepa de levadura de fisión recombinante MB164, que expresa CYP11B2 humano, identificó dos análogos de testosterona como inhibidores de CYP11B2. Uno de estos compuestos (4-androsteno-3,17-diona) es un precursor de testosterona que muestra una CI50 de 3,11 μM para el ASWT humano¹⁷. Recientemente, More et al. informaron que en ratas hembras de seis meses expuestas prenatalmente a testosterona, los niveles de ARNm de CYP11B2 disminuyeron en 40% en comparación con los controles¹⁸ y Carsia et al. comunicaron que en las células adrenocorticales dispersas de lagarto ovariectomizado, la tasa basal de producción de aldosterona aumentó en 166%, respecto a las células masculinas intactas. La adición de testosterona revirtió este efecto¹⁹.

Nuestros resultados *in vitro* muestran un efecto inhibitor de la testosterona sobre la síntesis de aldosterona tanto en la ASWT como en la enzima ASCE. De acuerdo con los resultados

previamente reportados en modelos animales y celulares, hemos demostrado que los niveles altos de testosterona reducen la síntesis de aldosterona. Este efecto es un mecanismo regulador novedoso de la acción de la testosterona, lo que sugiere que se necesitan más estudios clínicos para evaluar el papel de la testosterona en el tamizaje y diagnóstico del aldosteronismo primario.

Conclusiones

El efecto inhibitorio de la testosterona sobre las enzimas ASWT o ASCE es una nueva acción no genómica de la testosterona, lo que sugiere que se necesitan más estudios clínicos para evaluar el papel de la testosterona en la detección y el diagnóstico del aldosteronismo primario.

Agradecimientos: CFL reconoce OpenEye Scientific Software y ChemAxon por las licencias académicas.

Referencias

- Mosso L, Carvajal C, Gonzalez A, Barraza A, Avila F, Montero J, et al. Primary aldosteronism and hypertensive disease. *Hypertension* 2003; 42 (2): 161-5.
- Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, et al. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2016, 101: 1889-916.
- Fardella CE, Mosso LM, Carvajal CA. [Primary aldosteronism]. *Rev Med Chil* 2008; 136 (7): 905-14.
- Monticone S, Losano I, Tetti M, Buffolo F, Veglio F, Mulatero P. Diagnostic approach to low-renin hypertension. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2018; 89 (4): 385-96.
- Carvajal CA, Campino C, Martínez-Aguayo A, Tichauer JE, Bancalari R, Valdivia C, et al. A new presentation of the chimeric CYP11B1/CYP11B2 gene with low prevalence of primary aldosteronism and atypical gene segregation pattern. *Hypertension* 2012; 59 (1): 85-91.
- Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, et al. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 1992; 355 (6357): 262-5.
- Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Ulick S, Lalouel JM. The molecular basis of glucocorticoid-remediable aldosteronism, a Mendelian cause of human hypertension. *Trans Assoc Am Physicians* 1992; 105: 64-71.
- Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Gutkin M, Fallo F, et al. Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nat Genet* 1992, 2(1):66-74.
- Ahmed AH, Gordon RD, Ward G, Wolley M, Kogovsek C, Stowasser M. Should aldosterone suppression tests be conducted during a particular phase of the menstrual cycle, and, if so, which phase? Results of a preliminary study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015; 83 (3): 303-7.
- Campino C, Trejo P, Carvajal CA, Vecchiola A, Valdivia C, Fuentes CA, et al. Pregnancy normalized familial hyperaldosteronism type I: a novel role for progesterone? *J Hum Hypertens* 2015; 29 (2): 138-9.
- Vecchiola A, Lagos CF, Fuentes CA, Allende F, Campino C, Valdivia C, et al. Different effects of progesterone and estradiol on chimeric and wild type aldosterone synthase in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* 2013; 11: 76.
- Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 2001; 37(5): 1199-208.
- McGann M. FRED pose prediction and virtual screening accuracy. *J Chem Inf Model* 2011; 51(3): 578-96.
- Gallant S, Alfano J, Charpin M, Brownie AC. The inhibition of rat adrenal cytochrome P-45011 beta gene expression by androgens. *Endocr Res* 1992; 18(2): 145-61.
- Kau MM, Lo MJ, Wang SW, Tsai SC, Chen JJ, Chiao YC, et al. Inhibition of aldosterone production by testosterone in male rats. *Metabolism* 1999; 48 (9): 1108-14.
- Ajdzanovic VZ, Jaric IM, Zivanovic JB, Filipovic BR, Sosic-Jurjevic BT, Ristic NM, et al. Histological parameters of the adrenal cortex after testosterone application in a rat model of the andropause. *Histol Histopathol* 2016; 31(11): 1209-20.
- Hakki T, Hubel K, Waldmann H, Bernhardt R. The development of a whole-cell based medium throughput screening system for the discovery of human aldosterone synthase (CYP11B2) inhibitors: old drugs disclose new applications for the therapy of congestive heart failure, myocardial fibrosis and hypertension. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 125(1-2): 120-8.
- More AS, Mishra JS, Hankins GD, Kumar S. Prenatal Testosterone Exposure Decreases Aldosterone Production but Maintains Normal Plasma Volume and Increases Blood Pressure in Adult Female Rats. *Biol Reprod* 2016; 95 (2): 42.
- Carsia RV, McIlroy PJ, John-Alder HB. Modulation of adrenal steroidogenesis by testosterone in the lizard, *Coleonyx elegans*. *Gen Comp Endocrinol* 2018; 259: 93-103.