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

Running head:Testosterone and aldosterone synthase

PhDAndrea Vecchiola1,2,3\*, PhDCristóbal A. Fuentes1,2,3, PhDCristian A. Carvajal1,2,3, Carmen Campino1,2,3, Fidel Allende3,4, PhDAlejandra Tapia-Castillo1,2,3, PhDCarlos F. Lagos5, MDCarlos E. Fardella1,2,3

1Departamento de Endocrinología,Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de 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; 5Facultad de Medicina y Ciencia, Universidad San Sebastián.

**Corresponding author:** Prof. Carlos Fardella, MD

 Departamento de Endocrinología

 Escuela de Medicina

 Pontificia Universidad Católica de Chile

 Diagonal Paraguay 362, Piso 4,

 Santiago, CHILE

 PHONE: (56-2) 2354-3095

 e-mail: cfardella@med.puc.cl

**Funding:** This study was supported by grants from the Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT) FONDECYT 1160695, CORFO 13CTI-21526-P1, and Iniciativa Científica Milenio IMII P09/016- F (ICM) grants. Centro Traslacional de Endocrinología UC (CETREN).

1 figura

**Word count:** 2212

**Antecedentes:** El hiperaldosteronismo familiar tipo I es causado por la generación de la enzima aldosterona sintasa quimérica (ASCE) que está regulada por ACTH en lugar de angiotensina II. Hemos informado que las enzimas nativas (ASWT) y la aldosterona sintasa quimérica (ASCE) in vitro, son inhibidas por la progesterona y no afectadas por estradiol. **Objetivo:** explorar la acción directa de la testosterona sobre las enzimas ASWT y ASCE. Métodos: Se transfectaron transitoriamente células HEK-293 con plasmidios que contenían los cADN de ASWT o ASCE. Se evaluó el efecto de la testosterona sobre las actividades de la enzima AS incubando células HEK transfectadas, añadiendo desoxicorticosterona (DOC) o DOC junto con dosis crecientes de testosterona. La producción de aldosterona se midió mediante HPLC-MS /MS. **Resultados:** En este sistema, la testosterona inhibió el ASWT (inhibición del 90% a cinco µM, IC50 = 1,690 µM) con mayor eficacia y potencia que ASCE (inhibición del 80% a cinco µM, IC50 = 3,176 µM). Los estudios de modelamiento molecular mostraron una orientación diferente de la testosterona en las estructuras cristalinas ASWT y ASCE. **Conclusiones:** El efecto inhibidor 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.

**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 did not affect. **Aim:** To explore the direct action of testosterone on ASWT and ASCE enzymes. **Methods:** HEK-293 cells were transiently transfected with vectors containing the full ASWT or ASCE cDNAs. The effect of testosterone on AS enzyme activities were evaluated incubating HEK-cells transfected with enzymes 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, 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.

**Hyperaldosteronism, Aldosterone synthase, Testosterone, Hek-293**

**Antecedentes:** El hiperaldosteronismo familiar tipo I es causado por la generación de la enzima aldosterona sintasa quimérica (ASCE) que está regulada por ACTH en lugar de angiotensina II. Hemos informado que las enzimas nativas (ASWT) y la aldosterona sintasa quimérica (ASCE) in vitro, son inhibidas por la progesterona y no afectadas por estradiol. **Objetivo:** explorar la acción directa de la testosterona sobre las enzimas ASWT y ASCE. Métodos: Se transfectaron transitoriamente células HEK-293 con plasmidios que contenían los cADN de ASWT o ASCE bajo el control de un promotor fuerte. Se evaluó *in vitro* el efecto de distintas concentraciones de testosterona (0-10μM)sobre las actividad de la enzima AS. Se incubaron células HEK transfectadas, añadiendo desoxicorticosterona (DOC 1,5 μM) o DOC junto con dosis crecientes de testosterona. El medio de ensayo en las células sólo tiene DMEM, sin suero y con la concentración de testosterona descrita. La producción de aldosterona se midió mediante HPLC-MS /MS. **Resultados:** En este sistema, la testosterona inhibió el ASWT (inhibición del 90% a cinco µM, IC50 = 1,690 µM) con mayor eficacia y potencia que ASCE (inhibición del 80% a cinco µM, IC50 = 3,176 µM). Los estudios de modelamiento molecular mostraron una orientación diferente de la testosterona en las estructuras cristalinas ASWT y ASCE. **Conclusiones:** El efecto inhibidor 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.

**Keywords**: Testosterone; Aldosterone synthase; CYP11B2; Aldosterone biosynthesis.

El aldosteronismo primario (AP) es una causa conocida de hipertensión. Los individuos con esta condición representan casi el 10% de la población hipertensiva y la prevalencia del AP aumenta con la gravedad de la enfermedad hipertensiva. [1]. La alta prevalencia del AP puede detectarse utilizando el índice de actividad de aldosterona sérica / renina plasmática (ARR) para el cribado 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 (FH-1 a FH-IV) junto con el síndrome de aldosteronismo primario, convulsiones, anomalías neurológicas (PASNA) [2-4]. El FH-I, también llamado aldosteronismo remediable con glucocorticoides, representa sólo del 0,5 al 1% de la AP

 [5] .

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 11β-hidroxilasa (CYP11B1) y aldosterona sintasa (CYP11B2). Estos genes son 95% idénticos en la secuencia de nucleótidos [5-8]. La enzima 11β-hidroxilasa (gen CYP11B1) se expresa normalmente en ambas zonas de la corteza suprarrenal: fasciculada y glomerulosa, cataliza la biosíntesis de cortisol y aldosterona, respectivamente. En el fasciculado, 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 PA [9]. 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 alta [10]. 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 efecto [11].

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 mujeres [12]. 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 generaciones [10], 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 enzimas [11]. 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 anteriormente [11]. 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 anterior [11]. La eficiencia transfectada fue comparable entre las diferentes construcciones.

Los niveles de expresión de ARNm de ASCE y ASWT en células HEK-293 transfectadas fueron similares a los descritos en un estudio anterior [11].

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 Km = 1,163 µM y Vmax = 36,98 µM / 24 h para ASWT y Km = 1,191 µM y Vmax = 27,08 µM / 24 h para ASCE [11]. En este sistema, analizamos el efecto de la testosterona entre 0 y 10 microM (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 ASCE [13]. 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 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, IC50 = 1,690 µM) con mayor eficacia y potencia que la enzima quimérica (ASCE, 80% de inhibición a cinco µM, IC50 = 3,176 µM).

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 bioensayo [11]. Sin embargo, la testosterona mostró mayor potencia y eficacia similar 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 una menor capacidad inhibitoria. Las interacciones restantes fueron muy similares a las publicadas para la progesterona [11].

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 realizaron en modelos animales o experimentales. Se ha informado que la testosterona y el andrógeno sintético metilandrostenodiol disminuyen la expresión del ARNm del citocromo P-450 11β en las mitocondrias suprarrenales de ratas hembra [14]. Kau y col. informaron que la concentración plasmática de aldosterona era mayor en ratas ovariectomizadas (Orx) sin reemplazo de testosterona y demostraron in vitro que la testosterona causaba una marcada disminución en la secreción de aldosterona por las células de la zona glomerulosa [15].

Posteriormente, Ajdžanović et al. comunicaron en ratas Wistar Orx de mediana edad que el volumen de las células y núcleos de glomerulosa de la zona aumentó significativamente en Orx tratado con testosterona animal en un 50% y 25% (p <0.05) respectivamente, pero la concentración sérica de aldosterona disminuyó en un 60% (p <0.05), todos comparados con los mismos parámetros en el grupo Orx [16]. 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 humano [17]. Recientemente, More et al. informaron que en ratas hembras de seis meses expuestas prenatalmente a testosterona, los niveles de ARNm de CYP11B2 disminuyeron en un 40% en comparación con los controles [18] y Carsia et al comunican que en las células adrenocorticales dispersas de lagarto ovariectomizado, la tasa basal de producción de aldosterona aumentó en un 166%, respecto a las células masculinas intactas. La adición de testosterona revirtió este efecto [19].

Nuestros resultados muestran un efecto inhibidor in vitro de la testosterona sobre la síntesis de aldosterona por ASWT o 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 cribado y diagnóstico del aldosteronismo primario.

**Conclusiones:** El efecto inhibidor de la testosterona sobre las enzimas ASWT o ASCE es una nueva acción de la testosterona no genómica, 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.

**References**

1. Mosso L, Carvajal C, Gonzalez A, Barraza A, Avila F, Montero J, Huete A, Gederlini A, Fardella CE: **Primary aldosteronism and hypertensive disease**. *Hypertension* 2003, **42**(2):161-165.

2. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young WF: **The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline**. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2016, **101**:1889-1916.

3. Fardella CE, Mosso LM, Carvajal CA: **[Primary aldosteronism]**. *Rev Med Chil* 2008, **136**(7):905-914.

4. Monticone S, Losano I, Tetti M, Buffolo F, Veglio F, Mulatero P: **Diagnostic approach to low-renin hypertension**. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2018, **89**(4):385-396.

5. Carvajal CA, Campino C, Martinez-Aguayo A, Tichauer JE, Bancalari R, Valdivia C, Trejo P, Aglony M, Baudrand R, Lagos CF *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.

6. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, Lalouel JM: **A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension**. *Nature* 1992, **355**(6357):262-265.

7. 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.

8. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Gutkin M, Fallo F, Gill JR, Jr., Feld L, Ganguly A, Laidlaw JC *et al*: **Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase**. *Nat Genet* 1992, **2**(1):66-74.

9. 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):303-307.

10. Campino C, Trejo P, Carvajal CA, Vecchiola A, Valdivia C, Fuentes CA, Delgado JF, Lagos CF, Aglony M, Carrasco C *et al*: **Pregnancy normalized familial hyperaldosteronism type I: a novel role for progesterone?** *J Hum Hypertens* 2015, **29**(2):138-139.

11. Vecchiola A, Lagos CF, Fuentes CA, Allende F, Campino C, Valdivia C, Tapia-Castillo A, Ogishima T, Mukai K, Owen G *et al*: **Different effects of progesterone and estradiol on chimeric and wild type aldosterone synthase in vitro**. *Reprod Biol Endocrinol* 2013, **11**:76.

12. Reckelhoff JF: **Gender differences in the regulation of blood pressure**. *Hypertension* 2001, **37**(5):1199-1208.

13. McGann M: **FRED pose prediction and virtual screening accuracy**. *J Chem Inf Model* 2011, **51**(3):578-596.

14. 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):145-161.

15. Kau MM, Lo MJ, Wang SW, Tsai SC, Chen JJ, Chiao YC, Yeh JY, Lin H, Shum AY, Fang VS *et al*: **Inhibition of aldosterone production by testosterone in male rats**. *Metabolism* 1999, **48**(9):1108-1114.

16. Ajdzanovic VZ, Jaric IM, Zivanovic JB, Filipovic BR, Sosic-Jurjevic BT, Ristic NM, Stankovic SD, Milosevic V: **Histological parameters of the adrenal cortex after testosterone application in a rat model of the andropause**. *Histol Histopathol* 2016, **31**(11):1209-1220.

17. 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):120-128.

18. 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.

19. 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.

**Figura 1. Efectos inhibitorios de la testosterona en la aldosterona sintasa de tipo silvestre (ASWT) y la aldosterona sintasa quimérica (ASCE).** Panel A: Efecto de la concentración de la testosterona en la producción de aldosterona por la ASWT, círculos negros y la ASCE, círculos blancos. El IC50 calculado fue de 1,690 µM para ASWT y de 3.176 µM para ASCE. Los datos se expresan como la media ± S.E.M. de 4 experimentos independientes. 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.

**Declaraciones**

**Consentimiento para la publicación:** Los autores confirman que revisan y aprueban la versión final del artículo.

**Disponibilidad de datos y materiales:** la disponibilidad de los datos será mediante carta de solicitud al autor correspondiente.

**Conflicto de intereses:** los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses. Los autores son los únicos responsables del contenido y la redacción de este artículo. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.

**Financiamiento:** Este estudio fue apoyado por becas de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT) FONDECYT 1160695, CORFO 13CTI-21526-P1 e Iniciativa Científica Milenio IMII P09 / 016-F (ICM). Centro Traslacional de Endocrinología UC (CETREN).