

LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Regulación de la función esteroideogénica
en testículo y glándula adrenal

*Regulation of steroidogenic function in
testis and adrenal gland*

*Regulação da função esteroideogênica em
testículo e glândula adrenal*

Omar P. Pignataro, Romina Pagotto, Casandra M.
Monzón, Marcos Besio, Carolina Mondillo.

Resumen

Si bien las hormonas hipofisarias LH y ACTH son los reguladores primarios de la esteroideogénesis tanto en células de Leydig (CL) como en la zona fasciculada (ZF) adrenal, respectivamente, evidencias crecientes indican que diversos factores, locales y externos, modulan sutilmente (regulación fina) la fisiología de las glándulas esteroideogénicas. El paso regulador de la esteroideogénesis es el transporte del colesterol a la membrana interna de la mitocondria para ser transformado a pregnenolona y la proteína StAR es muy importante en este proceso. La presencia de otras poblaciones en testículo (células de Sertoli, peritubulares, macrófagos y mastocitos) y en corteza adrenal (células endoteliales, macrófagos, mastocitos y células de la médula adrenal) llevó a enfocar el estudio hacia compuestos que son secretados por esos tipos celulares o incluso por las propias CL o ZF y que regulan las acciones respectivas de la LH y de la ACTH en forma autócrina y/o parácrina. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que factores tales como óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO) e Histamina (HA) modulan los efectos de las hormonas adenohipofisarias mencionadas. En ambos órganos, los diversos factores pueden actuar a través de distintos (o similares) sistemas transductores, ya sea para activar o inhibir la síntesis de esteroides. Además de la conocida participación del AMPc, otros segundos mensajeros están involucrados en la respuesta biológica final

Palabras clave: célula de Leydig * células corticoadrenales * esteroideogénesis * óxido nítrico * hemo oxigenasa * histamina

Summary

Although steroidogenesis in both Leydig (CL) and zona fasciculata (ZF) adrenal cells are under the primary control of pituitary hormones LH and ACTH, respectively, increasing evidence suggests that local or external factors modulate (fine tuning) the physiology of steroidogenic glands. The limit-

ing step in the synthesis of all steroid hormones is the transport of the substrate—cholesterol—from the outer to the inner mitochondrial membrane, where it is converted into pregnenolone. The participation of StAR protein in the mechanism is very important in this process. The presence of other cell types in testis (Sertoli and peritubular cells, macrophages and mast cells) and in the adrenal cortex (endothelial cells, macrophages, mast cells and the near medullary cells) led to focus this study in factors secreted by these cell types or even the same Leydig or ZF cells that are able to modulate LH and ACTH actions in an autocrine or paracrine way. These studies have shown that the NO/NOS, HO/CO and histamine systems modulate the effect of the above mentioned pituitary hormones. These factors can act through similar or different signal transduction pathways to activate or inhibit steroid synthesis. In addition to the very well documented participation of cAMP in the mechanism of action of both hormones, other second messengers are also involved in the generation of the final biological effect.

Keywords: Leydig cells * corticoadrenal cells * steroidogenesis * nitric oxide * heme oxygenase * histamine

Resumo

Embora os hormônios hipofisários LH e ACTH sejam os reguladores primários da esteroideogénesis tanto em células de Leydig (CL) quanto na zona fasciculada (ZF) adrenal, respectivamente, evidências crescentes indicam que diversos fatores, locais e externos modulam sutilmente (regulação fina) a fisiologia das glândulas esteroideogénicas. O passo regulatório da esteroideogénesis é o transporte do colesterol para a membrana interna da mitocôndria para ser transformado em pregnenolona e a proteína StAR é muito importante neste processo. A presença de outras populações em testículo (células de Sertoli, peritubulares, macrófagos e mastócitos) e em córtex adrenal (células endoteliais, macrófagos, mastócitos e células da medula adrenal) levou a focar o estudo em compostos que são secretados por esses tipos celulares ou inclusive pelas próprias CL ou ZF e que regulam as ações respectivas da LH e da ACTH em forma autócrina e/ou parácrina. Nosso grupo de trabalho tem demonstrado que fatores tais como óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO) e Histamina (HA) modulam os efeitos dos hormônios adeno-hipofisários mencionados. Em ambos os órgãos, os diversos fatores podem atuar através de diferentes (ou similares) sistemas transdutores, seja para ativar ou inibir a síntese de esteroides. Além da conhecida participação do AMPc, outros segundos mensageiros estão envolvidos na resposta biológica final

Palavras chave: célula de Leydig * células córtico-adrenais * esteroideogénesis * óxido nítrico * hemo oxigenase * histamina

La función normal del testículo, dependiente de las gonadotropinas hipofisarias, involucra la producción de espermatozoides en los túbulos seminíferos y la síntesis de andrógenos, principalmente testosterona, en las células intersticiales de Leydig (CL). La producción de tes-

tosterona es imprescindible para la función sexual normal, el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, la espermatogénesis normal, y el mantenimiento de la hematopoyesis y de la masa muscular y ósea.

En los últimos años se ha aceptado que, si bien la hormona luteinizante hipofisaria (LH) es el regulador principal de la esteroidogénesis testicular, factores producidos por las diversas poblaciones celulares del testículo (células de Sertoli, peritubulares, macrófagos y mastocitos) modulan las acciones de la hormona, actuando de forma autócrina y/o parácrina. Dichos factores serían también capaces de modular a la LH en su papel como regulador de la diferenciación y proliferación de las CL inmaduras.

En forma semejante a lo descrito para testículo, si bien la esteroidogénesis adrenal es regulada principalmente por la hormona ACTH, los diversos tipos celulares que conforman la estructura de la corteza y de la médula suprarrenal, secretan compuestos que pueden modular la acción hormonal. Los corticosteroides producidos en respuesta a ACTH (aldosterona en la zona glomerulosa, y cortisol - o corticosterona en roedores en la zona fasciculada) están implicados en una variedad de mecanismos fisiológicos, incluyendo aquellos que regulan la inflamación, el sistema inmune, el metabolismo de hidratos de carbono, el catabolismo de proteínas, los niveles electrolíticos en plasma y los que caracterizan la respuesta frente al estrés. ACTH es, además, responsable del mantenimiento de la integridad anatómica y funcional de la glándula adrenal, lo cual también estaría sujeto a regulación local.

Sobre la base de publicaciones previas de nuestro grupo de trabajo, los sistemas óxido nítrico sintasa/óxido nítrico (NOS/NO) y hemo oxigenasa/monóxido de carbono (HO/CO) y la histamina (HA), modulan los efectos de las hormonas adenohipofisarias mencionadas

1- SISTEMAS NOS/NO Y HO/CO

El NO es un radical libre inorgánico gaseoso, cuya función como mensajero intracelular ha sido ampliamente establecida en una gran variedad de tipos celulares. La enzima óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la síntesis de NO y L-citrulina a partir de L-arginina. Se han identificado al menos tres isoformas de NOS, producto de tres genes distintos: la nNOS (NOSI), la iNOS (NOSII) y la eNOS (NOSIII). El NO modula la esteroidogénesis en células granulosa-luteales del ovario humano y en células de zona glomerulosa adrenal. Trabajos propios y de otros grupos han demostrado que el NO regula la síntesis de esteroides en CL, en ZF de rata y en células glomerulosas bovinas (1-4). En particular, el trabajo de Del Punta *et al.* de 1996 tiene 137 citaciones según la base de datos Scopus, de las cuales 52 son en los últimos 5 años, lo cual muestra la vigencia y reconocimiento de nuestros resultados

Por su parte, se ha propuesto al CO, producido por el clivaje oxidativo del hemo, como un modulador con funciones semejantes a las del NO. El CO es producido en la reacción catalizada por la HO, en la que se genera asimismo biliverdina e hierro. Clásicamente se ha asociado esta actividad enzimática con el catabolismo de hemoproteínas. Sin embargo, en forma más reciente, se han descrito efectos citoprotectores relacionados con la actividad de HO. Hasta el momento se han caracterizado tres isoformas de la enzima: la HO-1 o inducible y las HO-2 y 3 que son constitutivas. Resultados de nuestro grupo y de otros han permitido la identificación de HO-1 y de HO-2 en células de ZF adrenal de rata, en la línea celular Y1, y en CL tumorales MA-10 y normales de rata (5) (6). Dado que la HO regula los niveles celulares de hemoproteínas, su actividad modularía los niveles de las enzimas dependientes de citocromo P450, esenciales en el camino esteroidogénico. La expresión constitutiva de HO-2 en testículo y glándula adrenal probablemente cumpla esa función.

Evidencias experimentales de los últimos años demuestran que los sistemas de generación y los mecanismos de acción del NO y del CO coinciden en diversos aspectos. Ambos mediadores comparten al menos un blanco de acción común como es el grupo hemo de la guanilil ciclasa soluble, y su acción se ha asociado a un aumento en los niveles de GMPc. Una estrategia biológica para evitar esta redundancia podría consistir en la regulación mutua y coordinada entre ambos sistemas enzimáticos. En este sentido, resulta cada vez más evidente que ambos mediadores no actúan siempre en forma independiente, sino que uno puede modular la actividad del otro. Se ha demostrado que el NO induce la expresión de HO-1 y que la HO podría regular los niveles de la hemoproteína NOS. En macrófagos obtenidos de animales inyectados con LPS, la HO-1 actuaría como un inhibidor fisiológico de NOS disminuyendo la disponibilidad del grupo hemo para la actividad de la iNOS. También se ha sugerido que hay un sinergismo entre CO y NO para proveer citoprotección. Se están desarrollando experimentos que intentarán ver si estos mecanismos son posibles en nuestros modelos experimentales.

Los procesos infecciosos e inflamatorios comprometen fuertemente las funciones testicular y adrenal. Sin embargo, los mecanismos involucrados en estos efectos aún no han sido elucidados. La inflamación involucra, entre otros procesos, la activación de monocitos, macrófagos y mastocitos, lo que lleva a la producción de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS) citotóxicas, las cuales modulan la síntesis de esteroides en CL y en células adrenales. La producción de estos mediadores, que ocurre en forma sistémica y también localmente, se incrementa ante un estímulo como el LPS. Al respecto, el aumento en la muerte celular programada (apoptosis, autofagia) o no

programada (necrosis) ocurre durante la injuria celular y puede contribuir a la etiología de varios estados fisiopatológicos. La HO-1 (a través de alguno de sus productos: CO, biliverdina y/o bilirrubina) confiere citoprotección en varios tipos celulares inhibiendo la apoptosis, la inflamación y la proliferación celular. Dicho efecto de la HO-1 puede involucrar diferentes sistemas de transducción de la señal que incluye, entre otros, p38MAPK, PI-3-K/AKT o NFκB (7-9). Estamos estudiando si la inducción de HO regula la proliferación de células de Leydig testiculares.

2- HISTAMINA

Clásicamente reconocida como mediadora en procesos inflamatorios, la histamina (HA) ha sido generalmente asociada a los mastocitos presentes en casi todos los tejidos. Sin embargo, también se ha descrito síntesis de HA en basófilos, plaquetas, células endoteliales y neuronas, y existen evidencias de su participación en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. La síntesis de HA se produce a partir del aminoácido L-histidina, en una reacción catalizada por la enzima L-histidina descarboxilasa (HDC). HA ejerce sus múltiples efectos a través de la unión a receptores acoplados a proteínas G en la membrana de sus células blanco. Los mismos han sido designados HRH1, HRH2, HRH3 y HRH4, y se diferencian en su patrón de expresión y mecanismos de transducción de la señal (10, 11). Varios de los procesos en los que HA interviene como modulador involucran proliferación celular y/o apoptosis. Más aún, HA tendría efectos pro apoptóticos o anti apoptóticos según el tipo celular.

Tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, el efecto final de HA sobre la proliferación celular y/o apoptosis estaría definido por el subtipo de receptor con el que la amina interactúa en la membrana de sus células blanco, lo cual desencadena la activación de mecanismos de transducción de la señal específicos según el tipo celular. Estos incluyen la activación o inhibición de las vías MAPK/ERK, IKK/NF-κB, SAPK/JNK y JAK/STAT, en el caso de la regulación de la proliferación celular, y cambios en la expresión de proteínas de la familia BCL2 en el caso de inducción de apoptosis. La mayoría de los trabajos realizados hasta el momento involucran receptores HRH1 y HRH2, pero en los últimos años se centró la atención en los subtipos HRH3 y HRH4 y su papel en la regulación de la proliferación celular. Al respecto, cabe destacar que evidencias recientes indican que HRH3 y HRH4 se expresan en diferentes líneas celulares de glándula mamaria humana, tanto normales como transformadas, siendo la expresión de HRH3 significativamente mayor en estas últimas. Además, se demostró una correlación entre la expresión de HRH3, HDC y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), y un efecto estimulador

de HA mediado por HRH3 sobre la migración de las células malignas. Por su parte, la activación de receptores HRH4 mostró un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular, induciendo apoptosis (12, 13). Se están realizando estudios relacionados con los subtipos HRH3 y HRH4 y con la regulación de la proliferación celular.

Existen muy pocas evidencias en la literatura acerca del posible papel de la HA como modulador de la fisiología de las células esteroideogénicas. Se vio que HA estimula la síntesis de progesterona a través de receptores del subtipo HRH2 por un mecanismo mediado por AMPc, en folículos preovulatorios de rata. También se ha reportado que HA tiene un efecto estimulador directo sobre la secreción de progesterona y estradiol en células de la granulosa humana, sugiriendo un rol fisiológico en la regulación de la función de dichas células durante el ciclo menstrual. Respecto a las funciones reproductivas en el macho, Mayerhofer *et al.* (14) han sugerido que HA estimula la esteroidogénesis a través de los receptores HRH1 en el parénquima testicular del hámster dorado. Además, dos trabajos recientes sugieren, por un lado, la existencia de un sistema histaminérgico en testículo humano (15) y por otra parte, que la HA estaría involucrada en la maduración del testículo, ya que en ratones KO para HDC, se observó atrofia testicular parcial, alteraciones morfológicas de las CL y esteroidogénesis disminuida (16). Al respecto en este punto, en nuestro conocimiento, los 3 trabajos publicados por nuestro grupo en células de Leydig, representan las mayores contribuciones en el tema (17-19). Además, hemos publicado, por invitación del Editor, un capítulo de libro (20).

Los niveles testiculares de HA presentan variaciones a diferentes edades, siendo considerablemente mayores en ratas prepúberes, donde predominan formas inmaduras de células de Leydig, en forma simultánea con un mayor número de mastocitos intersticiales. Los altos niveles de HA hallados en animales prepúberes estarían asociados a un incremento en la proliferación y/o una inhibición de la diferenciación, mientras que los niveles más bajos, hallados en los animales adultos, estarían asociados a una disminución de la proliferación, a un aumento de la diferenciación, y a la regulación de las funciones diferenciadas. Estas diferentes concentraciones de HA en distintos estadios estarían de alguna manera correlacionadas con los efectos bifásicos que hemos observado previamente.

Considerando los estudios que realizó nuestro grupo en CL y dada la escasa, contradictoria y poco actualizada bibliografía acerca de la acción directa de la HA sobre la corteza adrenal, es que se están realizando estudios en células córticoadrenales (21). Los efectos de ACTH en la glándula adrenal incluyen la estimulación de la síntesis de esteroides y una marcada vasodilatación reflejada por el aumento en el flujo sanguíneo a través de la glándula. Se han localizado mastocitos en las paredes

de arteriolas en el punto de contacto de la corteza adrenal con la cápsula de tejido conectivo, y se ha sugerido que la HA y la serotonina producidas por dichas células incrementan el flujo del medio de perfusión y la secreción de esteroides en la glándula aislada perfundida en ausencia de ACTH. También se sugiere que la HA causa relajación de arteriolas córticoadrenales y que estimula la síntesis de aldosterona en células glomerulosas (ZG) adrenales bovinas. En lo que respecta a proliferación, un trabajo reciente (22) compara la expresión de proteínas y genes relacionados con la HA entre cortezas adrenales humanas normales y tumores adrenocorticales, demostrando un patrón de expresión diferencial entre ambos, en cuanto a la expresión de la enzima HDC, contenido de histamina y perfil de expresión de los receptores.

Uno de los puntos de integración entre los factores mencionados consiste en investigar si alguno de los efectos de la HA involucra a la modulación del sistema de las hemo oxigenasas (HO). Tal estudio se fundamenta en que recientemente hemos descrito (19) que concentraciones de HA inhibitorias de la esteroidogénesis en CL actúan, al menos en parte, a través de la activación del sistema NOS/NO. Esto concuerda con resultados anteriores de Del Punta y col (1) acerca de que el NO inhibe el proceso esteroidogénico. Si hubiere una regulación recíproca entre los sistemas NOS/NO y HO/CO y su relación con los parámetros de estrés oxidativo (incluyendo la producción de ROS) tal como planteamos en el bloque 1, entonces la HA regularía ambos sistemas a través de uno o más de sus subtipos de receptores. Si así fuere, los resultados representarían un novedoso sistema de regulación multifactorial que podría extrapolarse no sólo a otros sistemas esteroidogénicos, sino también a varios tipos celulares con diferentes funciones biológicas.

Otro punto de vista de la importancia de estos estudios radica en que los resultados obtenidos atraerán atención hacia nuevos efectos colaterales potenciales del uso de antihistamínicos, que podrían alterar el normal funcionamiento del testículo y la glándula adrenal, comprometiendo la fertilidad humana y la producción de hormonas esenciales para la vida.

Referencias bibliográficas

1. Del Punta K, Charreau EH, Pignataro OP. Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1996; 137: 5337-43
2. Cymeryng CB, Dada LA, Podesta EJ. Effect of nitric oxide on rat adrenal zona fasciculata steroidogenesis. *J Endocrinol* 1998; 158(2): 197-203.
3. Sainz JM, Reche C, Rábano M, Mondillo C, Patrignani ZJ, Macarulla JM, Pignataro OP, *et al.* Effects of nitric oxide on aldosterone synthesis and nitric oxide synthase activity in glomerulosa cells from bovine adrenal gland. *Endocrine* 2004; 24: 61-72.
4. Reche C Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Quilmes. 2005.
5. Pomeranec Y, Grion N, Gadda L, Pannunzio V, Podesta EJ, Cymeryng CB Adrenocorticotropin induces heme oxygenase-1 expression in adrenal cells. *J Endocrinol* 2004; 180(1):113
6. Piotrkowski B, Monzón C, Pagotto R, Reche C, Besio M, Cymeryng C, Pignataro OP, *et al.* Effects of heme oxygenase isozymes on Leydig cells steroidogenesis. *J Endocrinol* 2009; 203: 155-65.
7. Morse D, Lin L, Choi A, Ryter S. Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2009; 47: 1-12.
8. Was H, Dulak J, Jozkowicz A. Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy. *Current Drug Targets* 2010; 11: 1551-70.
9. Leffler CW, Parfenova H, Jaggar J. Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator. *Am J Physiol Heart Circ* 2011; 301(1): H1-H11.
10. Falus A, Darvas S, Grossman N (eds.) *Histamine: Biology and Medical Aspects*. Budapest: Karger; 2004.
11. Mohammed Shahid, Nancy Khardori, Rahat Ali Khan, (eds.) *Biomedical Aspects of Histamine: Current Perspectives*. Springer Science+Business Media B.V. 2010.
12. Medina V, Croci M, Crescenti E y col The role of histamine in human mammary carcinogenesis. H3 and H4 receptors as potential therapeutic targets for breast cancer treatment. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 27-35.
13. Medina V, Brenzoni P, Martinel Lamas D, Massari N, Mondillo C, Nunez M, *et al.* Role of histamine H4 receptor in breast cancer cell proliferation. *Frontiers in Biosciences* 2011; 3: 1042-60.
14. Mayerhofer A, Bartke A, Amador A, Began T. Histamine affects testicular steroid production in the golden hamster. *Endocrinology* 1989; 125: 2212-4.
15. Albrecht M, Frungieri M, Gonzalez-Calvar S, Meineke V, Kohn F, Mayerhofer A. Evidence for a histaminergic system in the human testis. *Fertil Steril* 2005; 83: 1060.
16. Pap E, Racz K, Kovacs JK, *et al.* Histidine decarboxylase deficiency in gene knockout mice elevates male sex steroid production. *J Endocrinol* 2002; 175 (1): 193-9
17. Mondillo C, Patrignani Z, Reche C, Rivera E, Pignataro OP. Dual role of histamine in modulation of Leydig cell steroidogenesis via H1 and H2 receptor subtypes. *Biol Reprod* 2005; 73(5): 899-907.
18. Mondillo C, Falus A, Pignataro O, Pap E. Prolonged histamine deficiency in histidine decarboxylase gene knockout mice affects regulation of Leydig cell function by LH/hCG. *J Androl* 2007; 28(1): 86-91.
19. Mondillo C, Pagotto RM, Piotrkowski B, Reche CG, Patrignani ZJ, Cymeryng CB, *et al.* Involvement of nitric oxide synthase in the mechanism of histamine-induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis via histamine receptor subtypes in Sprague-Dawley Rats. *Biol Reprod* 2009; 80(1): 144-52.

20. Mondillo C, Pignataro OP. Novel role for Histamine through classical H1 and H2 receptors: regulation of Leydig cell steroidogenesis and its implications for male reproductive function. In: "Biomedical Aspects of Histamine: Current Perspectives". Chapter 17. 2010 Ed: M. Shahid-Springer. pp: 383-94.
21. Pagotto R, Mondillo C, Piotrkowski B, Besio M, Cymeryng C, Pignataro OP. La histamina como modulador directo de la esteroidogénesis en células córtico-adrenales. *Medicina* 2007; Vol 67: 82.
22. Szabó PM, Wiener Z, Tömböl Z, *et al.* Differences in the expression of histamine-related genes and proteins in normal human adrenal cortex and adrenocortical tumors. *Virchows Arch* 2009; 455(2): 133-42.

LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA MOLECULAR

Estudios genéticos y moleculares en hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa

Molecular and Genetic studies in 21-hydroxylase deficiency

Estudos Genéticos e Moleculares em Hiperplasia Suprarrenal Congênita por Déficit de 21-Hidroxilase

Liliana Dain^{1,2}, Cecilia Fernández^{1,2},
Melisa Taboas², Noemí Buzzalino², Liliana Alba²,
Eduardo Charreau¹,

1. Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET.
2. Centro Nacional de Genética Médica, ANLIS.

Resumen

La Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) por déficit de 21-hidroxilasa representa la enfermedad autosómica recesiva de mayor frecuencia y la causa del 90-95% de los casos de HSC. El objetivo de nuestro trabajo es la caracterización molecular de los defectos genéticos asociados a este déficit. En la actualidad 650 familias han sido caracterizadas, entre las cuales hallamos 7 mutaciones novedosas ubicadas en regiones codificantes, sitios de *splicing* y en una región regulatoria. Estudios de modelado molecular indican diferencias en la estabilidad de la proteína mutada y/o de la carga de aminoácidos de superficie y resultados preliminares demostrarían

una disminución de la actividad residual *in vitro*. Por su parte, estudios *in silico* predicen que la variante de la región regulatoria alteraría la topología y curvatura del ADN. Los ensayos funcionales sugieren diferencias en la tasa transcripcional del gen. Asimismo, hemos observado una gran variabilidad en la estructura genómica que contiene al CYP21A2 (módulo RCCX) y hemos podido establecer que muchas de las pacientes No Clásicas poseen sólo un alelo con mutación o bien ninguno, lo que sugeriría que los valores hormonales considerados para la inclusión de estos pacientes estarían sobrestimando la frecuencia de la patología.

Palabras clave: deficiencia de 21-hidroxilasa * caracterización molecular * mutaciones novedosas

Summary

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency is the most frequent inborn error of metabolism, and it accounts for 90–95% of CAH cases. The goal of our study is to fully determine all the molecular defects leading to 21 hydroxylase deficiency in Argentinian patients. So far, 650 families have been characterized. Our analysis revealed the presence of 7 novel mutations not previously described in the literature, located in the coding region, splicing sites and a variant located in a distal regulatory region. In silico analyses of novel coding point mutations revealed changes in protein stability or in the surface charge of the mutant enzymes. Functional preliminary results suggest that the enzymatic activity is impaired. Similarly, bioinformatic studies predict that the variant in the distal regulatory region introduces distortions in the local conformation of DNA. In vitro assays suggest differences in the transcriptional activity of the gene. In addition, a great variability in the genomic structure of the RCCX module was found where the CYP21A2 gene is located. On the other hand, our analyses revealed that the cut-off value in the ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone test might overestimate the diagnosis of the non-classical form by including some patients with heterozygous status.

Key words: 21-hydroxylase deficiency * molecular characterization * novel mutations

Resumo

*A Hiperplasia Suprarrenal Congênita (HSC) por déficit de 21-hidroxilase representa a doença autossômica recessiva de maior frequência e a causa de 90-95% dos casos de HSC. O objetivo do nosso trabalho é a caracterização molecular dos defeitos genéticos associados a este déficit. Na atualidade, 650 famílias têm sido caracterizadas, dentre as quais encontramos 7 mutações novas localizadas em regiões codificantes, sítios de *splicing* e numa região regulatória. Estudos de modelagem molecular indicam diferenças na estabilidade da proteína mutada e/ou da carga de aminoácidos de superfície e resultados preliminares demonstrariam uma diminuição da atividade residual *in vitro*. Por sua vez, estudos *in silico* predizem que a variante da região regulatória alteraria a topologia e curvatura do DNA. Os ensaios funcio-*